

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

SC/C/1963

ESTRUCTURA Y EXPRESION DE LOS GENES DE
TRES ISOFORMAS DE ACTINA EN *Artemia*.



R.B.C. 60274

MARIASUN ORTEGA SEDANO

Madrid, Octubre de 1994

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

**ESTRUCTURA Y EXPRESION DE LOS GENES DE
TRES ISOFORMAS DE ACTINA EN *Artemia*.**

Memoria que presenta, para optar al grado de
doctor en Ciencias Biológicas, la licenciada
Mariasun Ortega Sedano

Director: Dr. **Leandro Sastre Garzón**
Colaborador Científico del C.S.I.C.

Instituto de Investigaciones Biomédicas del C.S.I.C.

Madrid, Octubre de 1994

A mis padres y Miguel.

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas con las que he convivido durante los últimos 4 años, el apoyo que me han brindado y las alegrías y buenos ratos que hemos compartido. Una parte de esta Tesis es un poco suya. No sería posible enumerarlos a todos, por lo que desde estas líneas hago extensivo mi agradecimiento a todos ellos.

Si quisiera, sin embargo, agradecer explícitamente a Leandro su disponibilidad y buen carácter permanente. Su valía científica y humana ha permitido la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Act: actina

BSA: seroalbúmina bovina

NBT: "nitroblue tetrazolium"

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PIPES: ácido piperazina-1,4-dietanosulfónico

ufp: unidad formadora de placa

X-fosfato: 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
1. Características biológicas de la actina	3
2. Estructura de la actina	4
2.1 Descripción de la secuencia. Estructura primaria	4
2.2 Modificaciones post-traduccionales	5
2.3 Estructura tridimensional	6
2.4 Isoformas	8
2.5 Genética molecular. Mutantes	8
2.6 Genes de secuencia similar	9
3. Organización de la familia de genes de actina	9
3.1 Número de genes de actina	9
3.2 Agrupamiento de genes	10
3.3 Unidades transcripcionales	10
3.4 Intrones	11
4. Expresión durante el desarrollo	12
5. Relaciones evolutivas	14
6. <i>Artemia</i> como sistema biológico	15
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y METODOS	19
1. MATERIALES	19
1.1 Soluciones y tampones	19
1.2 Material biológico	19
1.2.1 Cepas bacterianas	19
1.2.2 Vectores	19
1.2.3 <i>Artemia</i>	19
1.3 Genotecas y sondas	20
1.3.1 Genotecas	20
1.3.2 Sondas	20
1.4 Oligonucleótidos	20
2. METODOS	21
2.1 Cultivo de <i>Artemia</i>	21
2.2 Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	21
2.3 Rastreo de genotecas	21
2.4 Obtención de ácidos nucleicos	22
2.4.1 Aislamiento de DNA de bacteriófagos	22
2.4.2 Aislamiento de DNA de plásmidos	22

2.4.3 Aislamiento de RNA de <i>Artemia</i>	22
2.5 Mapas de restricción.....	23
2.6 Análisis de Northern.....	23
2.7 Secuenciación y análisis de secuencias.....	23
2.8 PCR.....	24
2.8.1 Amplificación de fragmentos de DNA.....	24
2.8.2 PCR anclado.....	24
2.9 Determinación del inicio de transcripción.....	25
2.9.1 Extensión del cebador.....	25
2.9.2 Protección a Nucleasa S1.....	26
2.10 Análisis filogenético.....	26
2.11 Hibridaciones <i>in toto</i>	26
2.11.1 Fijación y permeabilización.....	27
2.11.2 Hibridación con oligonucleótidos.....	27
2.11.3 Detección.....	28
2.11.4 Montaje, microscopía y fotografía.....	28
RESULTADOS	29
1. Expresión de tres isoformas de actina de <i>Artemia</i>	29
1.1 Expresión temporal.....	29
1.2 Expresión tisular; <i>in toto</i>	33
2. Caracterización estructural de los genes de las tres isoformas de actina en <i>Artemia</i>	36
2.1 Actina 211.....	37
2.1.1 Mapa físico.....	37
2.1.2 Variaciones de secuencia del DNA genómico respecto al cDNA.....	40
2.1.3 Secuencias flanqueantes intrón-exón.....	41
2.2 Actina 302.....	42
2.2.1 Mapa físico.....	42
2.2.2 Variaciones de secuencia del DNA genómico respecto al cDNA.....	47
2.2.3 Secuencias flanqueantes intrón-exón.....	51
2.3 Actina 403.....	51
2.3.1 Mapa físico.....	51
2.3.2 Variaciones de secuencia del DNA genómico respecto al cDNA.....	54
2.3.3 Secuencias flanqueantes intrón-exón.....	56
3. Análisis de las secuencias 5' de las tres isoformas de actina en <i>Artemia</i>	58
3.1 Identificación de los posibles sitios de inicio de la transcripción.....	58
3.1.1 Ensayo de extensión del cebador.....	58
3.1.2 Ensayo de protección a Nucleasa S1.....	60
3.2 Análisis de las posibles regiones reguladoras de la transcripción.....	62

4. Estudios evolutivos. Relaciones filogenéticas.....	68
4.1 Localización de los intrones dentro de los genes de actinas.....	68
4.2 Análisis comparativo de las proteínas de actina de <i>Artemia</i>	71
4.3 Arbol filogenético.....	71
DISCUSION	76
1. Expresión temporal y espacial de tres isoformas de actina en <i>Artemia</i>	76
2. Caracterización estructural de los genes de tres isoformas de actina en <i>Artemia</i> . Estudio de sus regiones reguladoras.....	79
3. Relaciones evolutivas.....	85
CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFIA	91

INDICE DE FIGURAS

A	Estructura molecular de la actina.....	7
1	Expresión del mRNA de la isoforma Act 211 durante el desarrollo.....	30
2	Expresión del mRNA de la isoforma Act 302 durante el desarrollo.....	31
3	Expresión del mRNA de la isoforma Act 403 durante el desarrollo.....	32
4	Hibridaciones <i>in toto</i> de nauplias de <i>Artemia</i> con sondas específicas de genes de las isoformas de actina, Act 211, Act 302 y Act 403.....	35
5	Estructura del clon genómico λ gArAct26 correspondiente a la isoforma Act 211.....	38
6	Oligonucleótidos diseñados para el aislamiento y caracterización de clones genómicos correspondientes a la isoforma Act 211 de <i>Artemia</i>	39
7	Cambios en la secuencia del fago genómico λ gArAct26 respecto al cDNA de la isoforma Act 211 de <i>Artemia</i>	40
8	Secuencias flanqueantes de las uniones intrón-exón en la isoforma Act 211 de <i>Artemia</i>	42
9	Estructura de los clones genómicos λ gArAct22 y λ gArAct10A correspondientes a la isoforma Act 302.....	43
10	Esquema representativo de la reacción de PCR anclado.....	45
11	Secuencia de los 200 nucleótidos de la isoforma Act 302 de <i>Artemia</i> no presentes en los clones de cDNA.....	46
12	Oligonucleótidos diseñados para el aislamiento y caracterización de clones genómicos correspondientes a la isoforma Act 302 de <i>Artemia</i>	48
13	Hibridación de RNA con los oligonucleótidos 3 y 306 de la isoforma Act 302.....	49
14	Cambios en la secuencia del fago genómico λ gArAct22 respecto al cDNA en la isoforma Act 302 de <i>Artemia</i>	50
15	Cambios en la secuencia del fago genómico λ gArAct10A respecto al cDNA en la isoforma Act 302 de <i>Artemia</i>	50
16	Secuencias de las regiones de unión intrón-exón en la isoforma Act 302 de <i>Artemia</i>	52
17	Estructura de los clones genómicos λ gArAct5A y λ gArAct11A correspondientes a la isoforma Act 403.....	53
18	Oligonucleótidos diseñados para el aislamiento y caracterización de clones genómicos correspondientes a la isoforma Act 403 de <i>Artemia</i>	55
19	Cambios en la secuencia de los fagos genómicos λ gArAct5A y λ gArAct11A respecto al cDNA en la isoforma Act 403 de <i>Artemia</i>	56
20	Secuencias de las regiones de unión intrón-exón en la isoforma Act 403 de <i>Artemia</i>	57
21	Identificación de los posibles sitios de inicio de la transcripción por extensión del cebador.....	59

2 2	Ensayo de protección a Nucleasa S1.....	61
2 3	Secuencia de nucleótidos de la región 5' del gen de la isoforma Act 211.....	63
2 4	Secuencia de nucleótidos de la región 5' del gen de la isoforma Act 302.....	64
2 5	Secuencia de nucleótidos de la región 5' del gen de la isoforma Act 403.....	65
2 6	Posición de las posibles secuencias reguladoras dentro de las regiones promotoras de las tres isoformas de actina en <i>Artemia</i>	67
2 7	Cuadro comparativo de la posición de los intrones dentro de los genes Act 211, Act 302 y Act 403 de <i>Artemia</i>	68
2 8	Cuadro comparativo general de la posición de los intrones en los genes de actina de diferentes organismos.....	70
2 9	Secuencia completa de nucleótidos y aminoácidos del cDNA de la Act 302 de <i>Artemia</i>	72
3 0	Esquema comparativo de la secuencia de aminoácidos de las cuatro proteínas de actina descritas en <i>Artemia</i>	73
3 1	Arbol filogenético.....	74

RESUMEN

RESUMEN.

En el presente trabajo se ha estudiado, en primer lugar, la expresión de tres diferentes isoformas de actina durante el desarrollo embrionario de *Artemia*. Los mRNAs de dos de estas isoformas se encuentran presentes en el quiste y su expresión se induce ligeramente en estadios tempranos del desarrollo. El incremento principal se observa, sin embargo, entre las 6 y las 16 horas de desarrollo aunque las cinéticas de acumulación de los dos mRNAs son diferentes. Estos dos mRNAs corresponden a las isoformas denominadas Act 211 y Act 403, caracterizadas como isoformas citoplásmicas mediante ensayos de hibridación *in toto*. El mRNA de la tercera isoforma no se expresa en el quiste, induciéndose su expresión después de las 10 horas de desarrollo. Este mRNA corresponde a la isoforma Act 302, que presenta una expresión tisular específica de músculo, según se ha determinado también mediante ensayos de hibridación *in toto*.

Posteriormente se han aislado clones genómicos que contienen los genes completos de estas tres isoformas de actina. El gen de la Act 211 tiene un tamaño de 14.7 kb y está constituido por 4 exones. El gen de la Act 302 es menor, 10.5 kb pero, sin embargo, está formado por 6 exones. El gen de la Act 403 tiene un tamaño intermedio, 13.1 kb y contiene 7 exones. Todos los genes presentan un exón en posición 5' no codificante de muy pequeño tamaño (55 pb en la Act 211, 35 pb en la Act 302 y 31 pb en la Act 403). Existen 5 posiciones diferentes de inserción de intrones a lo largo de las secuencias codificantes. Una de ellas común a las tres isoformas, la situada entre los aminoácidos 41 y 42; las otras 4, situadas en los aminoácidos 121-122, 168, 246-247 y 301 son comunes en 2 de ellas. Mientras que los intrones situados en los codones 41-42 y 121-122 existen en otros muchos genes de actina, el intrón que interrumpe el codon 168 únicamente se ha descrito en *Artemia* y el nemátodo *Onchocerca volvulus*, el intrón situado entre los codones 246-247 solo se había encontrado en el alga verde *Volvox carterii* y el intrón situado en el codon 301 no se ha hallado en ningún otro organismo. El análisis de las regiones que preceden al primer exón de cada gen ha permitido identificar los sitios de inicio de la transcripción y efectuar un análisis estructural de las posibles regiones reguladoras situadas en estos promotores.

En un análisis evolutivo, se han comparado las tres isoformas de actina de *Artemia* con otras descritas tanto en invertebrados como en vertebrados. El árbol filogenético elaborado a partir de estos datos, muestra que la trayectoria evolutiva de los genes de las isoformas musculares y citoplásmicas ha sido totalmente diferente en los Crustáceos e Insectos dentro del filum de los Artrópodos.

SUMMARY.

In the first part of this Thesis project we have studied the expression of three different actin isoforms during *Artemia* embryonic development. The mRNAs coding for two of these isoforms are present in the cyst and their expression increases only slightly in the first hours of development. The main increase is observed between 6 and 16 hours of development although the pattern of induction is different for the two mRNAs. These two mRNAs code for the isoforms Act 211 and Act 403 that have been characterized as cytoplasmic actins by whole-mount hybridization experiments. The mRNA coding for the third actin isoform is not present in the cyst and its expression is induced after 10 hours of development. This mRNA is coded by the isoform Act 302 that is specifically expressed in muscle, as determined by whole-mount hybridization experiments.

In the second part of this study, genomic clones containing the complete genes coding for these isoforms have been isolated. The Act 211 gene is 14.7 kb long and is divided into 4 exons. The Act 302 gene is smaller, 10.5 kb, but is formed by 6 exons. The Act 403 gene is 13.1 kb long and contains 7 exons. All these genes have a very small exon in their 5' untranslated region (55 pb in the Act 211, 35 pb in the Act 302 and 31 pb in the Act 403). Five different intron insertion sites have been found in the coding region of these genes. One of these introns, placed between the codons coding for amino acids 41 and 42, is common for the three genes; the other four introns, placed in the codons coding for amino acids 121-122, 168, 246-247 and 301, are common to two of the three genes. While the introns placed between the codons 41-42 and 121-122 are also present in many other actin genes, the intron that interrupts the codon 168 has only been described in the nematode *Onchocerca volvulus*, the intron placed between codons 246 and 247 has been only found in the green alga *Volvox carterii*, and the intron placed at codon 301 had not been found in any other organism. The analyses of the regions upstream of the first exon of each gene has allowed to determine the transcription initiation sites and the identification of putative regulatory regions in these promoters.

In an evolutive analyses, we have compared the three *Artemia* actin isoforms with other vertebrate and invertebrate isoforms. The phylogenetic tree elaborated from these data has shown that the evolutive pathways of the cytoplasmic and muscular isoforms have been different in Crustaceans and Insects, in the Arthropoda phylum.

INTRODUCCION

INTRODUCCION.

1. CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE LA ACTINA.

La actina fue descubierta por Straub en el año 1942, en un extracto de tejido muscular (Straub, 1942). Es una proteína muy abundante que forma parte de todos los organismos eucariotas. Se encuentra predominantemente en los compartimentos citoplasmáticos de la célula, aunque también se ha descrito su presencia en el núcleo (Nakayasu y Ueda, 1983). Forma parte del citoesqueleto y lleva a cabo funciones contráctiles en multitud de procesos, tales como la división celular, citoquinesis, movimiento ameboide y transporte intracelular. La actina es además un componente esencial del aparato contráctil de los tejidos musculares. Tiene un peso molecular entre 42 y 43 kDa y está formada por 374 ó 375 aminoácidos en la mayor parte de las especies estudiadas. En eucariotas superiores existen diferentes isoformas, codificadas por distintos genes. Inicialmente se identificaron tres isoformas de actina mediante geles bidimensionales, que se denominaron α , β y γ , atendiendo a sus diferentes puntos isoeléctricos. Estos valores varían de 5.4 a 5.9, incrementándose desde la isoforma α , la más ácida, hasta la isoforma γ (Zechel y Weber, 1978). Con posterioridad se ha descrito que la isoforma α es una mezcla de 3 isoformas diferentes. Las isoformas de actina se expresan diferencialmente en distintos tejidos y en diferentes estadios del desarrollo. La isoformas α han sido descritas exclusivamente en músculo. Las isoformas β y γ , denominadas actinas citoplásmicas se han encontrado en todo tipo de células no musculares, aunque existe una isoforma γ específica de músculo liso.

En ausencia de sal, la actina existe como una proteína globular denominada G- actina. Consiste en una cadena polipeptídica sencilla, unida en posiciones específicas de la molécula a un nucleótido (ATP) y a un catión divalente. Esta cadena presenta la habilidad de autoensamblarse en presencia de sal formando filamentos, denominándose entonces F- actina. La F-actina es un polímero formado por uniones no covalentes, que se ensambla espontáneamente *in vitro* bajo condiciones iónicas fisiológicas (50-100 mM KCl, pH 7.0-7.1 y 1 mM Mg^{2+}). La F- actina es el mayor componente del citoesqueleto que es altamente dinámico y está constantemente polimerizándose y depolimerizándose con una vida media del orden de minutos. Este recambio tan rápido es una consecuencia intrínseca de la actividad ATPasa de la actina: cada monómero de actina cataliza la hidrólisis de una molécula de ATP durante un solo ciclo de ensamblaje y disgregación. Los microfilamentos de actina median los procesos de motilidad y cambio de forma de las células y de distribución de componentes intracelulares. Por esta razón, la localización, extensión y polaridad de los microfilamentos se encuentra regulada por un gran número de proteínas de unión a actina que inducen o inhiben su polimerización. La actividad de las proteínas de unión a actina se regula, a su vez, mediante rutas de transducción

de señales, iniciadas en la superficie celular, que median la respuesta de la célula a los factores ambientales. El amplio grupo de proteínas que se unen a actina se puede dividir en 5 familias: familia de la gelsolina, familia de las proteínas de casquete, familia de proteínas de unión a monómeros, familia de las α -actininas y un 5º grupo muy heterogéneo, llamado simplemente proteínas de unión a actina (Sheterline y Sparrow, 1994).

La F- actina es también el mayor componente de las miofibrillas del tejido muscular. En las miofibrillas, la F- actina se ensambla formando los filamentos delgados. Estos interaccionan con las cabezas de la miosina de los filamentos gruesos, para producir la contracción muscular. Las miofibrillas presentan en el músculo una estructura muy organizada y estable. Las estructuras contráctiles de células no musculares están, sin embargo, mucho menos organizadas que las redes de filamentos de las células musculares. Este hecho puede ser significativo, ya que las células no musculares pueden presentar así un alto grado de plasticidad, generando fuerzas no solamente en una dimensión, sino a través de una red tridimensional que permita a la célula responder a diferentes situaciones fisiológicas. Las células musculares, por el contrario, únicamente se mueven en una dirección, la de contracción.

2. ESTRUCTURA DE LA ACTINA.

2.1 Descripción de la secuencia. Estructura primaria.

Además de ser una de las proteínas más abundantes en la naturaleza, la actina es también una de las más conservadas, encontrándose presente en todos los organismos eucariotas pero no en los procariotas. La homología de secuencia que existe, por ejemplo, entre la actina de una ameba y la de un humano es de un 95%. Además, muchos de los cambios que se producen en la secuencia son conservativos y están restringidos a unas pocas regiones dentro de la cadena polipeptídica. De los 375 aminoácidos de que se compone la cadena polipeptídica madura, 249, al menos, son idénticos en el 95% de las actinas conocidas. Actualmente se conocen 57 posiciones invariables en todas las actinas descritas. A pesar de esta gran homología se pueden distinguir diferentes tipos de actina por su secuencia de aminoácidos.

Una de las clasificaciones más generales existente utiliza como motivo diferencial la secuencia del extremo amino terminal (Pollard y Cooper, 1986). Atendiendo a este criterio las actinas pueden dividirse en actinas de clase I y actinas de clase II. Las actinas de clase I presentan un extremo NH₂- terminal cuya secuencia es Met- X, donde X es un residuo ácido y las actinas de clase II, generalmente presentan una secuencia del tipo Met-Cis-X.

Actualmente se conocen 103 secuencias proteicas de actinas, cuyas características y referencias se describen en Sheterline y Sparrow (1994). Entre todas ellas, la más estudiada es la isoforma α de músculo esquelético de vertebrados, por lo que el resto de secuencias se han comparado con ella a la hora de efectuar los alineamientos de secuencia. En dichos alineamientos, todas las secuencias presentan residuos peculiares, algunos de los cuales pueden emplearse para definir un grupo particular de actinas. Se ha descrito así una alanina extra en el extremo NH_2 - terminal en las actinas de plantas, una prolina en el aminoácido 323 de equinodermos o una treonina en la posición 234 de Artrópodos. Además de estas sustituciones puntuales de aminoácidos a lo largo de la secuencia, existen regiones que presentan mayor variabilidad. Una de ellas es el extremo NH_2 - terminal, muy variable pero sin perder nunca su fuerte carácter ácido. Esta región de la proteína está implicada en la unión a miosina. La miosina requiere carga negativa, pero la especificidad de secuencia parece no ser fundamental.

2.2 Modificaciones post-traduccionales.

El procesamiento del extremo NH_2 - terminal se produce en todas las actinas descritas hasta el momento y ocurre durante la traducción o inmediatamente después de ella. Mediante una reacción enzimática catalizada por una acetilasa, un grupo acetilo es incorporado al grupo α -amino del aminoácido terminal de la cadena. El significado fisiológico de este proceso no se conoce aún, sin embargo, en mutantes de actina expresados en levadura, incapaces de efectuar el procesamiento, se observan problemas en la polimerización (Hennessey et al., 1991). El procesamiento del extremo amino terminal difiere de unas actinas a otras: en las actinas de clase I, la metionina es acetilada, se elimina luego y finalmente se acetila el residuo ácido que le precede formando así la proteína madura (Rubenstein y Martin, 1983b). En las actinas de clase II, la metionina es eliminada como aminoácido libre, le sigue luego un proceso de acetilación y eliminación de la cisteína, para acabar con la acetilación del residuo ácido siguiente (Rubenstein y Martin, 1983b). El procesamiento no es específico de tejido ya que lisados de reticulocito de conejo son capaces de efectuar correctamente ambos tipos de procesamiento (Rubenstein y Martin, 1983a). Las levaduras y los hongos presentan una ligera variante del proceso de modificación del extremo amino-terminal. Tienen una actina de clase I, sin embargo, se procesan acetilando la metionina terminal que no es eliminada sino que permanece en la proteína madura (Cook et al., 1994).

Además de la acetilación del extremo amino terminal se producen en las actinas otras modificaciones post-traduccionales. Ninguna de ellas constituye un fenómeno generalizado, sino que se han descrito de forma puntual. Entre ellas pueden citarse la metilación en la histidina 73 a partir de una metil-transferasa, la fosforilación en serinas, treoninas y tirosinas *in vitro*, a partir de proteínas kinasas y ADP- ribosilaciones.

2.3 Estructura tridimensional.

La estructura atómica de la proteína se determinó en 1990 mediante un análisis de cristalografía de rayos X del complejo entre la actina de músculo esquelético de conejo y la DNAsa I de páncreas bovino con una resolución de 2.8 Å (Kabsch et al., 1990). La estructura de la molécula obtenida a partir de estos estudios se representa mediante α -hélices y láminas β y se muestra en la figura A, copia del modelo publicado por Hennessey et al. (1993). En ella aparecen detallados los extremos amino y carboxilo terminal. Las α -hélices se representan mediante cilindros y las láminas β mediante flechas. Los números indican los residuos iniciales y finales de dichas estructuras secundarias. La molécula de ATP unida a la cadena polipeptídica aparece como un diagrama lineal, mientras que el catión se representa como una esfera. La molécula de actina está dividida en 2 dominios de un tamaño aproximadamente equivalente, separados por una hendidura que contiene el catión y el nucleótido. Los dos dominios se conectan covalentemente mediante dos puntos de la cadena polipeptídica. Esta estructura permite un movimiento relativo de ambos dominios, por lo que ha recibido el nombre de región bisagra. Los dos dominios mayores ya descritos (denominados I y II), pueden ser a su vez divididos en otros dos subdominios menores (denominados A y B). Se han descrito estructuras de la actina formando complejos con otras proteínas que normalmente se unen a ella: complejo actina y segmento 1 de la gelsolina determinado por cristalografía de rayos X (McLaughlin et al., 1993), complejo profilina-actina determinado por NMR (Vinson et al., 1993), complejo actina-miosina determinado por cristalografía de rayos X (Rayment et al., 1993), y complejo actina-profilina obtenido también a partir de un estudio cristalográfico (Schutt et al., 1993). Los resultados obtenidos en todos los casos han sido muy similares, a pesar de algunas diferencias observadas en la posición de los subdominios IB y IIB y la posición del extremo carboxilo terminal.

La dilucidación de la estructura monomérica de la α -actina acomplejada con la DNAsa (Kabsch et al., 1990) fue el punto de partida para comenzar a entender como se unen a la actina otras proteínas: se ha identificado el sitio de unión de la miosina en la superficie externa del dominio IA, el sitio de unión de la DNAsa I en los dominios IB y IIB y el de la profilina en el extremo carboxilo terminal y el dominio IA (Hennessey et al., 1993).

Examinando de forma detallada la estructura tridimensional de la molécula se comprueba que existe un dominio estructural de 5 láminas β antiparalelas rodeadas por α -hélices que se repite en las regiones IA y IIA, a cada lado de la hendidura de unión a ATP, lo que sugiere una duplicación de dicho dominio en algún momento previo a la evolución de los eucariotas (todos contienen actina). Este dominio estructural aparece también en proteínas como la hexoquinasa o en proteínas de choque térmico (Bork et al., 1992), por lo que se considera la posibilidad de

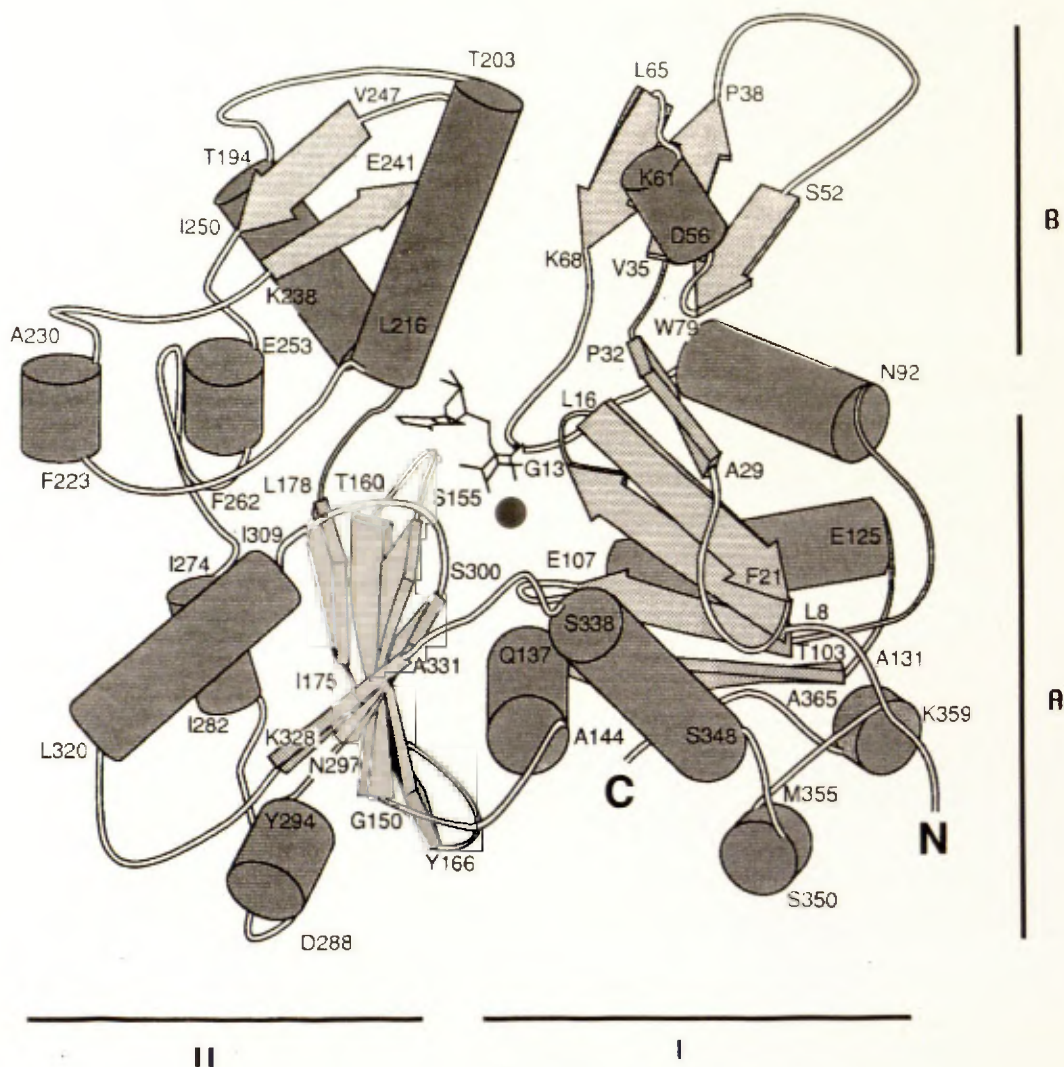


Figura A: **Estructura molecular de la actina.** Representación de la molécula de actina, en la que se detallan los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminales. Los números indican los aminoácidos iniciales y finales de las α -hélices (cilindros) y de las láminas β (flechas). El ATP está representado mediante un diagrama lineal y el catión mediante una esfera. Se señalan además los 2 dominios mayores I y II y sus correspondientes subdominios menores A y B. Reproducido a partir de Hennessey et al. (1993).

que todas estas proteínas tengan un origen evolutivo común. Las funciones biológicas que desempeñan estas proteínas son diferentes en todos los casos, pero todas ellas mantienen la capacidad de unir e hidrolizar ATP. Esta función primordial puede haber sido la propiedad que ha mantenido y diversificado la estructura durante la evolución.

2.4 Isoformas.

La familia de los genes de actina codifica por un gran número de isoformas que probablemente evolucionaron a partir de un ancestro común (Hightower y Meagher, 1986). Difieren entre si solamente en unos pocos aminoácidos. Esta heterogeneidad es mayor en el extremo amino terminal, aunque existen cambios repartidos a lo largo de toda la molécula. Las isoformas de actina difieren en propiedades intrínsecas de la molécula como la estabilidad termodinámica y las características de polimerización. Algunas cambian también su afinidad por la profilina (Akhurst et al., 1987), DNAsa, α -actinina o tropomiosina. La importancia de estas pequeñas diferencias *in vivo* no está clara, pero se ha observado una segregación diferencial de las isoformas dentro de las propias estructuras de la célula (Herman, 1993), lo que sugiere que desempeñan funciones diferentes. Uno de los casos más estudiados son las actinas de los vertebrados en que las isoformas musculares difieren de las citoplásmicas en una serie de posiciones características. Parte de estas posiciones se sitúan en el dominio 1A de la proteína, en la región de unión a miosina, pudiendo contribuir a que estas isoformas tengan distintas constantes de unión a dicha proteína.

2.5 Genética molecular. Mutantes.

Las técnicas de genética molecular pueden emplearse para estudiar la relación entre la secuencia de aminoácidos de una proteína y la función que realiza, examinando los efectos que determinadas mutaciones producen en la estructura secundaria y en último término en la funcionalidad de la proteína. Se han descrito mutantes de actina en varios sistemas biológicos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum* y en cultivos de células humanas (Hennessey et al., 1993). Estos mutantes pueden expresarse *in vitro*, mediante transcripción y traducción a partir de un lisado de reticulocitos de conejo o bien *in vivo*, con la ventaja de que la actina mutada se encuentra en su medio habitual, pudiéndose conocer si mantiene la capacidad de asociación con otras proteínas para organizarse en estructuras funcionales. Hennessey et al. (1993) han recopilado todas las mutaciones de actina que se han descrito en los distintos sistemas biológicos. Estos estudios están permitiendo identificar las regiones de la proteína que participan en la interacción con otras proteínas, tales como la miosina, DNAsa I o profilina así como aquellas que participan en la unión

del ATP o en las diversas funciones fisiológicas de la proteína, tales como el ensamblaje de las microfibrillas, la formación del sarcómero o la contracción muscular.

2.6 Genes de secuencia similar.

Se ha descrito en diferentes especies una familia de proteínas denominadas "proteínas de secuencia similar a actina". Este es el caso, por ejemplo, del gen ACT2 de *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica para una proteína de 391 aminoácidos cuya homología con el gen de actina ACT1 es de sólo un 53.6%. En *Schizosaccharomyces pombe* también se ha descrito una proteína ACT2 con 427 aminoácidos, cuya divergencia respecto a la ACT1 es de un 52.6% (Lees-Miller et al., 1992). Experimentos de complementación genética demuestran que no es posible sustituir ACT1 por ACT2 o viceversa en ninguno de los organismos, lo que sugiere que ambos genes son esenciales para la viabilidad celular y que desempeñan funciones diferentes. El hecho de que las proteínas codificadas por estos genes presenten una mayor longitud es debido a inserciones producidas en algunos lazos, conservándose los motivos estructurales de la actina tradicional. Por ejemplo, las proteínas ACT2 conservan la región de unión a ATP. Todavía se desconoce si estas proteínas se originaron a partir de las actinas y cuáles son sus funciones específicas.

3. ORGANIZACION DE LA FAMILIA DE GENES DE ACTINAS.

3.1 Número de genes de actina.

Como se ha indicado anteriormente, la mayor parte de los organismos estudiados tienen varios genes que codifican para isoformas diferentes de actina. El número de genes de actinas se ha estimado en un amplio espectro de organismos por Southern-blot, dot-blot e hibridaciones *in situ* (Tobin et al., 1980). Puede concluirse de estos estudios que no existe una correlación entre la complejidad del organismo y el número de genes de actinas que presentan. Algunos eucariotas inferiores como *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* y el protozoo *Tetrahymena thermophila* y *Tetrahymena pyriformis* (Hirono et al., 1987), tienen un solo gen de actina. La mayor parte de las especies, sin embargo, tienen varios genes de actina (Adam et al., 1991). El número mayor se da en plantas. Estas familias multigénicas codifican generalmente para diferentes isoformas, pero en *Physarum polycephalum*, el protozoo *Taenia solium* (Schwob y Martin, 1992) y *Caenorhabditis elegans* muchos genes de actina codifican para la misma secuencia de aminoácidos.

Entre los organismos utilizados como modelos biológicos, *Drosophila melanogaster* contiene 6 genes de actina, dos que codifican actinas citoplásmicas y cuatro actinas musculares.

El número de genes estimado en *Drosophila melanogaster* por Southern-blot fue de 3 a 5. El análisis definitivo, sin embargo, se produjo mediante una hibridación *in situ* de una sonda marcada correspondiente a un gen de actina con los cromosomas politénicos de las glándulas salivares (Fyrberg et al., 1980). El genoma de *Caenorhabditis elegans* contiene 4 genes de actina (Krause et al., 1989) y el de *Dictyostelium discoideum* al menos 17 (MacKeown et al., 1978). El número de genes de actina en algunos vertebrados es de 8-10 en el pollo, más de 8 en la rata y entre 20 y 30 en humanos. Sin embargo el número de proteínas conocidas en estos 3 organismos es de 6 solamente (Singer y Berg, 1991), sugiriendo que el resto de los genes encontrados puedan ser pseudogenes no funcionales.

3.2 Agrupamiento de genes.

El agrupamiento o disgregación de los genes de actinas en el genoma es también muy variable y depende del organismo. Así los genes de *Drosophila melanogaster* (Fyrberg et al., 1980 y Tobin et al., 1980), *Physarum polycephalum* (Schedl y Dove, 1982), pollo (Cleveland et al., 1981), ratón (Minty et al., 1983) y humano (Engel et al., 1981) se encuentran dispersos a lo largo del genoma. Por el contrario, *Caenorhabditis elegans* (Files et al., 1983) y el erizo de mar (Minor et al., 1987), muestran agrupamientos de 2 y hasta 3 genes. Se ha descrito también un agrupamiento en un cordado primitivo (*Halocynthia roretzi*) (Kusakabe et al., 1992), que contiene, en una distancia genómica de 30 kb, 5 genes de actina orientados en el mismo sentido. Además han conservado todos ellos sus secuencias 5', lo que sugiere que estos genes se regulan de la misma manera. El agrupamiento génico de los miembros de la familia de las actinas en algunos organismos sugiere que la expresión de estos genes puede estar controlada de una manera coordinada. Esto puede ser muy ventajoso para la rápida acumulación de cantidades considerables de proteína en especies de desarrollo embrionario rápido.

3.3 Unidades transcripcionales.

Otra importante característica estructural de los genes de actina es la localización de los sitios de inicio y terminación de la transcripción, así como el estudio de esas regiones transcritas pero no traducidas. A diferencia de lo que ocurre con las regiones codificantes, estas secuencias carecen de cualquier homología de unos genes a otros, incluso entre isoformas de una misma especie. Las regiones 3' no traducidas se emplean frecuentemente, por lo tanto, como sondas moleculares específicas para detectar e identificar cada gen y su correspondiente mRNA durante el desarrollo (Mounier et al., 1992). Algunos genes de actinas presentan varios sitios diferentes de inicio de la transcripción y de poliadenilación. El caso más complejo conocido es el de la actina citoplásmica 5C de *Drosophila melanogaster* que tiene 2 exones 5' no codificantes que contienen 1 y 2 sitios de inicio de la transcripción, respectivamente, y, además,

5 sitios de poliadenilación en la región 3' no codificante (3 mayores y 2 menores). Esto genera múltiples transcritos, idénticos en la secuencia codificante, pero diferentes en las regiones no codificantes. Estas características no son exclusivas de *Drosophila melanogaster*, sino que aparecen también en otros insectos como *Bombyx mori* (Mounier y Prudhomme, 1991 y Mounier y Sparrow, 1993) y se hacen extensibles tanto a otros grupos de invertebrados como a vertebrados (Reddy et al., 1990). En todos los casos conocidos la elección de los extremos 5' y 3' se regula durante el desarrollo (Bond y Davidson, 1986 y Vigoreaux y Tobin, 1987).

3.4 Intrones.

El descubrimiento de los intrones, hace 15 años, condujo inmediatamente a la aparición de dos teorías opuestas que intentaban explicar su origen evolutivo (Cavalier-Smith, 1991). Una teoría mantiene que los intrones son tan antiguos como los genes. Esta es la denominada teoría del "origen temprano" de los intrones. Según ella, los procariotas, que carecen de intrones, deben habérselos perdido todos a lo largo de la evolución (Damell y Doolittle, 1986 y Gilbert et al., 1986). La segunda teoría se denomina del "origen tardío", ya que postula que los intrones tienen un origen más reciente y que se insertaron en los genes eucariotas después de la divergencia entre las líneas procariota y eucariota (Palmer y Logsdon, 1991 y Cavalier-Smith, 1985). Los intrones a menudo se encuentran situados entre dominios estructurales, lo que llevó a postular a los defensores del origen temprano de los intrones que cada exón constituía originalmente un dominio estructural o funcional independiente y que las proteínas se formaron por combinación de estos exones primitivos. Existen, sin embargo, muchos genes en los que no existe una correlación obvia entre la posición de los intrones en la estructura primaria y la estructura secundaria de la proteína, como es el caso de los genes de actina (Dibb y Newman, 1989 y Weber y Kabsch, 1994). Se han comparado 36 posiciones de intrones con la estructura tridimensional de la actina. La mayoría se encuentran al comienzo o al final de una estructura secundaria (α -hélice o lámina β), pero algunas interrumpen dichas estructuras. Además, la frecuencia con la que se encuentran los intrones en una u otra posición es la que se podría esperar si los intrones se distribuyeran al azar, por lo que se concluye que la distribución de los mismos es arbitraria (Weber y Kabsch, 1994). Se ha sugerido así que los intrones se han ido insertando durante la evolución eucariota (Cavalier-Smith, 1985). Existen evidencias de que los intrones de actinas y de otra familia multigénica (las tubulinas) se han ido insertando en regiones del gen que presentan la secuencia C/AAG*A/G, donde * es el punto de inserción del intrón. Estos estudios permiten concluir que, en estas familias génicas, los intrones son menos antiguos que las regiones codificantes, por lo que no han podido estar implicados en la evolución primaria de dichos genes (Dibb y Newman, 1989).

La lista de las posiciones de todos los intrones de actinas conocidas en la actualidad ha sido recopilada por Weber y Kabsch (1994). La posición de algunos intrones como, por ejemplo, el que aparece en la posición 41/42 de la secuencia codificante de los genes de actina se conserva entre organismos con una trayectoria evolutiva muy diferente, sugiriendo que pudiera ser muy antiguo. Otros intrones aparecen en posiciones específicas de especie o grupo y posiblemente se hayan ido adquiriendo en estadios más recientes de la evolución de los diferentes grupos eucariotas.

En general, la posición de los intrones en la estructura primaria de las actinas es característica de los diferentes grupos filogenéticos. Todas las actinas de vertebrados tienen intrones en las posiciones 41/42, 121/122, 267 y 327/328. Existe un intrón adicional en la posición 150 en la isoforma de músculo estriado y un intrón entre los aminoácidos 84 y 85 en las isoformas de músculo liso (Sheterline y Sparrow, 1994). Los invertebrados, en general, tienen menos intrones y en posiciones bastante más variables (Fyrberg et al., 1981 y Mounier y Sparrow, 1993). Los protozoos carecen de ellos.

4. EXPRESION DURANTE EL DESARROLLO.

La familia multigénica de las actinas es un sistema modelo muy útil para examinar los mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario porque, en especies que contienen varias isoformas, se ha demostrado que estas se expresan diferencialmente durante el desarrollo del embrión y de manera específica de tejido (Mohun et al., 1984 y Fyrberg et al., 1983). Existe en la bibliografía una amplísima colección de trabajos de expresión de genes de actinas, tanto en vertebrados como en invertebrados. En mamíferos en concreto McHugh y Lessard (1988) describen la expresión de α -actina vascular y γ -actina entérica en rata; Ordahl (1986) y Alonso et al. (1990) la coexpresión de α -actina cardíaca y esquelética; Tokunaga et al. (1988) la expresión de actinas citoplásmicas en ratón; Miwa et al. (1991) la expresión de γ -actina entérica en humano; Erba et al. (1988) la expresión de la γ -actina citoplásmica en humano; Hsu y Frankel (1987) el efecto del estrógeno sobre la expresión de diferentes isoformas de actina en rata, etc. En anfibios han sido descritos también varios trabajos de actinas citoplásmicas y musculares (Mohun et al., 1984; Stutz y Spohr, 1987 y Boardman et al., 1992). En algunas ocasiones varias isoformas pueden expresarse simultáneamente en el mismo tipo celular (Muscat et al., 1988 y Ordahl, 1986). Este fenómeno es muy frecuente a lo largo del desarrollo, pero también ocurre en algunos tejidos adultos, en los que una de las isoformas expresadas predomina sobre la otra.

En el caso de invertebrados y en concreto de Artrópodos, se han estudiado en profundidad 2 especies de Insectos (*Drosophila melanogaster* y *Bombix mori*). En ambos

existen isoformas que se expresan en tejidos musculares y en tejidos no musculares (Mounier y Sparrow, 1993). En *Bombix mori*, la actina A1 se expresa a niveles muy altos en todos los músculos del organismo durante el estadio larvario y en el tórax y abdomen en el adulto. La isoforma A2 se expresa también en tejido muscular pero mucho menos que la A1 y solamente en el estadio de pupa y en el tórax adulto. El gen A3 codifica para una isoforma citoplásmica que se ha detectado únicamente en tejidos no musculares (Mounier y Prudhomme, 1991). En *Drosophila melanogaster* existen cuatro genes de actinas musculares (57B, 79B, 87E y 88F) y dos citoplásmicos (5C y 42A). Las actinas 57B y 87E se expresan desde el embrión hasta el adulto (Fyrberg et al., 1983). Las actinas 79B (Courchesne-Smith y Tobin, 1989) y 88F se expresan sólo durante el estadio de pupa y en músculos adultos. La expresión de la actina 88F se limita estrictamente a los músculos indirectos de vuelo, donde no se expresa ninguna otra isoforma (Hiromi y Hotta, 1985). Las actinas 5C y 42A son citoplásmicas y se expresan a lo largo de todo el ciclo vital (larva, pupa y adulto) y en todos los tejidos (Fyrberg et al., 1983).

Los diferentes patrones de expresión de las distintas isoformas de actina han llevado al estudio de las regiones reguladoras de la transcripción génica de varios de estos genes, tanto en vertebrados como en invertebrados. La estructura de estas regiones no difiere mucho de las de otros genes. Los promotores de los genes de actina presentan una serie de secuencias consenso para la unión de factores generales de transcripción como, por ejemplo, la caja TATA, a la que se une el factor TFIID implicado en la unión de la RNA polimerasa II. Existen promotores de actina que presentan una caja TATA canónica, como la α -actina de músculo liso de humanos (Reddy et al., 1990) o la actina muscular 87E de *Drosophila melanogaster*. Otros genes de actina no presentan una secuencia idéntica a la consenso, pero si aparece en la posición señalada una secuencia similar que pudiera ser funcional actuando como un sustituto de la canónica. Entre estos promotores, nos encontramos al promotor distal de la actina 5C citoplásmica de *Drosophila melanogaster* (Vigoreaux y Tobin, 1987) y al promotor de la actina muscular 79B (Sánchez et al., 1983). Finalmente existen también genes de actina con promotores que carecen de la caja TATA, como el promotor proximal de la actina 5C de *Drosophila melanogaster* (Vigoreaux y Tobin, 1987), o el de la actina muscular 88F (Sánchez et al., 1983). Algunos promotores de actina también poseen sitios de unión para otros factores generales de transcripción como pueden ser la secuencia consenso CCAAT, sobre la que interaccionan los factores de transcripción CTF, y las cajas G-C, sobre las que interacciona el factor general Sp1 (LaThangue y Rigby, 1988). En el caso de las isoformas musculares aparecen además secuencias identificadas como consenso para la unión de factores de transcripción específicos de músculo. Así hay cajas CArG, sobre las que actúa el factor SRF, en la α -actina cardíaca de humano (Miwa et al., 1987) y en la α -actina de músculo liso, también de humano (Nakano et al., 1991). Se han encontrado también cajas E, a las que se unen los factores de transcripción de la familia Myo D, en el promotor y en el primer intrón (donde actúan como estimuladores de la transcripción) de la α -

actina cardíaca (Sartorelli et al., 1990). Finalmente, hay que reseñar la existencia de secuencias específicas de cada promotor, como la secuencia de 12 pb que aparece en la actina 5C de *Drosophila melanogaster* (Chung y Keller, 1990), con una importante función reguladora demostrada mediante ensayos *in vitro*, que no se ha identificado en ninguna otra actina de *Drosophila*, o la presencia de repeticiones directas o invertidas también con carácter regulador descritas en los genes musculares 79B y 88F de *Drosophila melanogaster* (Sánchez et al., 1983).

5. RELACIONES EVOLUTIVAS.

La actina es una de las proteínas caracterizadas en mayor número de especies. Como se indicó anteriormente se conocen 103 secuencias de actinas. Dichas secuencias han sido utilizadas para establecer árboles filogenéticos que indiquen las relaciones evolutivas existentes entre ellas. Debido a la gran conservación de estas proteínas, los programas de ordenador que generan árboles filogenéticos producen relativamente pocos grupos, reproducibles y que por tanto pueden considerarse significativos (Mounier et al., 1992). Por lo que a los animales superiores se refiere, se pueden distinguir tres grandes ramas evolutivas de las actinas: las actinas musculares de Cordados, las actinas citoplásmicas de Cordados y las actinas de Artrópodos. El que las actinas citoplásmicas y musculares de Cordados formen dos grupos distintos sugiere que la aparición de actinas citoplásmicas y musculares específicas es anterior a la aparición de los mismos (Miwa et al., 1991). Además, las actinas citoplásmicas de Cordados son más parecidas a las actinas de Artrópodos que a las actinas musculares de Cordados (Hightower y Meagher, 1986) lo que indica un origen común para estos genes (Mounier et al., 1992). Las actinas musculares de Insectos, tanto de *Drosophila melanogaster* (Díptero) como de *Bombyx mori* (Lepidóptero), forman un grupo separado de sus correspondientes actinas citoplásmicas (Mounier et al., 1992) aunque ambos grupos forman parte de la misma rama evolutiva.

Estos estudios evolutivos parecen demostrar que los genes de actina musculares surgieron a partir de los citoplásmicos al menos dos veces independientes, a lo largo de la evolución animal (Mounier et al., 1992). Toda la familia de genes de actina musculares de Vertebrados derivan probablemente de un único gen ancestral de los Cordados que comenzó a expresarse en células de músculo estriado, pero no en células de músculo liso en Urocordados y Cefalocordados. Posteriormente este gen se duplicó y uno de los genes producto de esta división, llegó a expresarse solamente en células de músculo liso. Durante la evolución de los primitivos anfibios a reptiles o en la propia evolución de los reptiles, ambos genes sufrieron una nueva duplicación, consiguiendo de este modo las 4 isoformas funcionales de músculo en Vertebrados: músculo estriado (cardíaco y esquelético) y músculo liso (vascular y entérico) (Vandekerckhove y Weber, 1984). Por su parte, los genes de actina musculares en Insectos

podrían haber emergido en la línea de los protóstomos, después de la separación de los Moluscos y los Artrópodos, por duplicación de un gen citoplásmico de actina ancestral, seguido de una divergencia evolutiva. Esta divergencia ha producido dos clases de isoformas musculares en Insectos: una presente en musculatura de larva y de adulto y otra presente únicamente en músculo de adulto. Los genes ancestrales de estas 2 isoformas estaban presentes antes de la separación de los Dípteros y los Lepidópteros, ya que ambos grupos las presentan (Mounier et al., 1992).

A nivel molecular se han seguido diferentes alternativas durante la evolución de los genes de actina musculares. En Insectos (*Bombyx mori* y *Drosophila melanogaster*), las secuencias codificantes de las actinas musculares presentan pequeñas variaciones. Por el contrario, las secuencias de las isoformas musculares de diferentes especies de vertebrados, desde los mamíferos hasta las aves, están estrictamente conservadas. El tiempo de separación entre los Dípteros y los Lepidópteros se estima en unos 240 millones de años, comparable al que existe entre los mamíferos y las aves. Además, los residuos específicos de músculo son diferentes en los 2 linajes. Por lo tanto, las vías evolutivas que han conducido a la aparición de los genes de actina musculares han debido ser diferentes en ambos grupos de organismos. Los genes de actina musculares podrían ser un ejemplo de evolución convergente, ya que, una vez formada la unidad contráctil, la función de las actinas musculares parece comparable en vertebrados y en músculo esquelético de Insectos (Mounier y Sparrow, 1993).

6. *Artemia* COMO SISTEMA BIOLÓGICO.

El trabajo presentado en esta Memoria forma parte de un proyecto general de estudio de los procesos de regulación génica durante el desarrollo de *Artemia*. Este organismo es un Crustáceo de la clase Phyllopoda, orden Anostraca que se utiliza como sistema biológico modelo en estudios de biología del desarrollo por su característico ciclo biológico, relativamente corto y fácilmente reproducible en el laboratorio (Decleir et al., 1987; Browne et al., 1991 y Warner et al., 1989). El cigoto, que puede originarse por vía sexual o partenogenética, se desarrolla en el ovisaco materno hasta el estadio de gástrula. En este punto, en función de distintos factores ambientales, el desarrollo embrionario puede seguir dos rutas diferentes: puede dar lugar a larvas nadadoras que se liberan al medio acuoso externo o bien puede detenerse en la fase de gástrula. En este caso, los embriones se recubren de una cubierta quitinosa y son liberados al exterior, donde sufren un proceso de desecación, entrando en un período de criptobiosis en el que cesa toda actividad metabólica. Estos embriones se mantienen así viables durante años y cuando las condiciones de hidratación y oxigenación vuelven a ser favorables, se reinicia su desarrollo. Al cabo de 15-18 horas, el embrión rompe la cubierta quitinosa del quiste (emergencia) y unas dos horas más tarde se libera de la capa membranosa

que le recubre (eclosión) dando lugar a larvas nadadoras. El período que transcurre entre la rehidratación del quiste y la emergencia, se caracteriza por transcurrir sin división celular ni síntesis de DNA (Koller et al., 1987). Incluso las primeras divisiones que se producen en el estadio de prenauplia son escasas y no son indispensables para el desarrollo posterior. En este mismo período se produce una activa diferenciación celular e histogénesis, de manera que en el embrión, en el momento de la emergencia, pueden distinguirse ya órganos como los ojos, las antenas o las mandíbulas (Sorgeloos, 1980). Estos quistes pueden adquirirse comercialmente así como reactivarse en el laboratorio mediante su incubación en unas condiciones de salinidad, oxigenación y temperatura adecuadas. El proceso de activación del quiste de *Artemia* ha sido estudiado por diversos autores para conocer los mecanismos que regulan el paso de un estadio inactivo, como es el quiste, a un proceso activo de morfogénesis y desarrollo. Se han estudiado varios aspectos de este proceso (Tate y Marshall, 1991 y Slegers, 1991) pero nuestro laboratorio está interesado en el estudio de la expresión génica.

La reactivación de la expresión génica es un proceso muy complejo, en el que intervienen distintos mecanismos, tanto a nivel transcripcional como traduccional (Sorgeloos, 1980). El primer paso de la reactivación se produce a nivel traduccional, con la utilización de mRNAs almacenados. Pocos minutos después de la rehidratación del quiste se detecta la formación de polisomas, en los que se empiezan a traducir los mRNAs almacenados (Amaldi et al., 1977). En el momento de entrar en criptobiosis el embrión contiene ya esos mRNAs en el citoplasma en forma de partículas de ribonucleoproteínas. Los embriones criptobióticos contienen también un gran número de ribosomas 80S y otros factores necesarios para el proceso de síntesis de proteínas, a pesar de lo cual ésta no se produce. La asociación de múltiples factores parece ser la causa de que la síntesis de proteínas esté bloqueada en el quiste y se active tras la rehidratación (Wahba y Woodley, 1984). Uno de ellos podría ser la activación de algún factor de iniciación (Moreno et al., 1991).

La impermeabilidad de los quistes a precursores de RNA ha impedido durante mucho tiempo analizar la síntesis de RNA en el período de desarrollo postgastrular previo a la emergencia. La utilización más recientemente de técnicas de biología molecular ha permitido conocer el curso temporal de la expresión de un cierto número de genes durante este período (Marco et al., 1991). Los quistes son inactivos en cuanto a síntesis de RNA. Entre las 5 y las 10 horas de desarrollo existe una acumulación importante de varios mRNAs (Sastre et al., 1989), entre ellos los que codifican para algunas de las distintas isoformas de actina (Macías y Sastre, 1990). No se conocen los factores implicados en esta activación transcripcional. En el quiste existen RNA-polimerasas (Osuna y Sebastián, 1980), por lo que lo más probable es que el DNA no se encuentre accesible a la maquinaria de transcripción. Esto puede deberse a múltiples causas: la cromatina del quiste puede presentar una estructura que no permita la transcripción,

pueden no existir factores de transcripción en el quiste, pueden existir dichos factores pero inactivos conformacionalmente, puede estar bloqueada la interacción entre los factores de transcripción o bien de estos con las RNA polimerasas, las RNA polimerasas pueden estar inactivas metabólicamente, etc. Una manera de abordar este problema es mediante el aislamiento de genes cuya expresión esté regulada específicamente durante el desarrollo en *Artemia*. En nuestro laboratorio se está llevando a cabo un proyecto centrado en el clonaje de este tipo de genes para afrontar posteriormente el estudio de los mecanismos responsables del control de su expresión durante el desarrollo. Se han aislado ya genes transcritos por la RNA polimerasa I (los que codifican para los RNA ribosomales 5,8; 18 y 25 S) (Gil et al., 1987), por la RNA polimerasa III (genes del rRNA 5S) (Cruces et al., 1989) y por la RNA polimerasa II. En el caso de estos últimos, se ha comenzado aislando clones de cDNA debido a la mayor facilidad de su caracterización, al ofrecer la posibilidad de predecir directamente la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifican. Se han aislado de este modo, clones que codifican para ubiquitina (Franco et al., 1994), cuatro isoformas de actina (Macías y Sastre, 1990), Na/K ATPasa (Macías et al., 1991), Ca-ATPasa (Palmero y Sastre, 1989) y el protooncogen ras (Díaz-Guerra et al., 1989).

Dentro de esta línea, esta Memoria describe el aislamiento de clones genómicos para tres isoformas de actina en *Artemia*, su caracterización estructural y el análisis de su expresión a lo largo del desarrollo. El interés particular del estudio de los genes de actina radica en que constituyen una familia génica muy conservada a lo largo de la evolución. Sin embargo, la expresión de cada isoforma se encuentra regulada temporal y espacialmente durante el desarrollo. Los genes de esta familia representan varios ejemplos distintos de regulación, cuya comparación puede aportar datos de gran interés. Otra ventaja práctica del estudio de estos genes es que los mRNAs que codifican para actinas se encuentran entre los más abundantes de la célula, lo que indica una transcripción muy activa.

La bibliografía de los últimos años se ha incrementado considerablemente con datos relativos a nuevas secuencias de genes de actinas así como al análisis de su organización génica en gran variedad de organismos. El análisis de la estructura primaria de estas isoformas así como la organización génica en un Crustáceo como *Artemia* es muy interesante desde el punto de vista evolutivo, ya que no existe ninguna actina descrita en este grupo. El grupo más cercano del que se han publicado múltiples trabajos es la clase de los Insectos. Establecer posibles relaciones evolutivas entre ambos grupos de Artrópodos y, de forma más amplia, con el resto de Invertebrados así como con Vertebrados puede ayudar tal vez a esclarecer algo más del complejo origen evolutivo de estos genes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS.

En nuestro grupo de trabajo se está llevando a cabo el análisis de varios genes de *Artemia* cuya expresión se encuentra regulada durante el desarrollo embrionario. El objetivo a largo plazo es conocer los mecanismos que mantienen inhibida la transcripción en el estadio de quiste y los que producen su activación una vez restablecido el desarrollo post-gastrular. Dentro de esta línea de trabajo, los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Estudio del patrón de expresión temporal y espacial de tres isoformas de actina durante el desarrollo embrionario de *Artemia*.
2. Caracterización estructural de los genes de estas tres isoformas de actina de *Artemia*, identificando los sitios de inicio de la transcripción y analizando las secuencias de las posibles regiones promotoras.
3. Análisis de las relaciones evolutivas existentes entre las isoformas de actina de *Artemia* y las caracterizadas en otros organismos, tanto Invertebrados como Vertebrados.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS.

1. MATERIALES.

1.1 Soluciones y tampones.

Todos los reactivos empleados en la realización de este trabajo fueron de grado analítico o grado apto para biología molecular. La composición de los tampones y soluciones se especifica en la descripción de los experimentos o bien en las citas correspondientes.

1.2 Material biológico.

1.2.1 Cepas bacterianas.

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado dos tipos diferentes de cepas de *Escherichia coli*:

- **NM522**: para la transformación, crecimiento de plásmidos y preparación de templados para la secuenciación de DNA de doble cadena. Fue cedida por la Dra. N. Murray y su genotipo se describe en Gough y Murray (1983).

- **NM621**: para la infección con el bacteriófago λ EMBL-3, en el rastreo de las genotecas genómicas. Fue cedida así mismo, por la Dra. N. Murray. Su genotipo es: hsd R, mcr A, mcr B, Sup E, rec D 1009, leu, pro, His.

1.2.2 Vectores.

Se han utilizado los siguientes:

- plásmido **pUC18** (Yanisch-Perron et al., 1985).
- plásmido **pGEM-T** (Promega).
- un vector derivado del bacteriófago λ : **λ EMBL-3** (Frischauf et al., 1983).

1.2.3 Artemia.

La especie utilizada en este trabajo ha sido *Artemia franciscana*. Los quistes deshidratados se adquirieron a la compañía San Francisco Bay Brand Inc. (Newark, California, USA). Casi en la totalidad de los experimentos, se usó esta especie bisexual de origen americano. Sin embargo, una de las genotecas genómicas empleadas en los rastreos presentaba una mezcla de poblaciones, entre la especie citada, y una especie partenogenética de origen euro-asiático: *Artemia parthenogenetica diploidica*.

1.3 Genotecas y sondas.

1.3.1 Genotecas.

Para clonar los tres genes de actinas fueron necesarios dos rastreos genómicos, que se realizaron en dos genotecas diferentes:

- Una genoteca genómica en λ EMBL-3, de una mezcla de poblaciones entre *Artemia franciscana* y *Artemia parthenogenetica diploidica* (Franco et al., 1994).
- Una genoteca genómica en λ EMBL-3 de *Artemia franciscana* (Escalante y Sastre, 1993).

1.3.2 Sondas.

En los rastreos genómicos se emplearon cinco tipos de sondas diferentes:

1.3.2.1: Un clon de cDNA ya caracterizado, pArAct 211 (Macías y Sastre, 1990).

1.3.2.2: Oligonucleótidos específicos de cada isoforma, complementarios a regiones no traducidas de los correspondientes clones de cDNA (Macías y Sastre, 1990).

- Oligonucleótido 2: Complementario al clon pArAct211 del nt 1310 al 1329.
- Oligonucleótido 3: Complementario al clon pArAct 302 del nt 1204 al 1223.
- Oligonucleótido 4: Complementario al clon pArAct 403 del nt 1254 al 1274.

1.3.2.3: Sonda 211-5': Fragmento 5', *Eco* RI- *Bgl* II, de 310 pb, del cDNA pArAct 211.

1.3.2.4: Sonda 302: Fragmento *Sal* I- *Sal* I, de 4.5 Kb, del clon genómico de la Act 302 obtenido en el primer rastreo, (clon que contiene los exones 3, 4, 5 y 6).

1.3.2.5: Sonda 403-3': Fragmento 3', *Kpn* I- *Bam* HI, de 386 pb, del cDNA pArAct 403.

El empleo del cDNA completo posibilitó, en una primera vuelta del rastreo, obtener clones positivos para las tres isoformas (la identidad entre su secuencia de nucleótidos es de aproximadamente un 80%) (Macías y Sastre, 1990). Entre estos clones positivos, otras sondas (oligonucleótidos específicos y sonda 211-5') nos permitieron seleccionar los correspondientes a cada isoforma en particular. La sonda 302 y el oligonucleótido 4, se emplearon en un segundo rastreo para completar las regiones 5' y 3' de los genes Act 302 y Act 403 respectivamente.

1.4 Oligonucleótidos.

Todos los oligonucleótidos empleados en la realización de este trabajo fueron sintetizados por Bio-Synthesis, Isogen, o en el sintetizador de oligonucleótidos del Instituto de

Investigaciones Biomédicas. Se han dividido en tres grupos, según sean complementarios a la isoforma Act 211, Act 302 o Act 403. En algunas ocasiones, por la alta homología de secuencia de las regiones codificantes, han podido emplearse para la hibridación o secuenciación de una isoforma diferente de aquella para la que originariamente se diseñaron. Además de estos oligonucleótidos específicos se han utilizado los oligonucleótidos generales del pUC18: directo y reverso, que hibridan a ambos lados del sitio de clonación de este vector.

2. METODOS.

2.1 Cultivo de *Artemias*.

Los quistes de *Artemia franciscana* se hidrataron en H₂O destilada, manteniéndolos a 4°C durante aproximadamente 2 horas, a una concentración de 3-6 g de quistes/l. Posteriormente se lavaron con agua destilada 2 ó 3 veces más, y se les añadió hipoclorito sódico al 5% junto con hielo, para decorionizarlos. Se mantuvieron en agitación hasta que tomaron un color anaranjado (aproximadamente 1 hora). Se añadió luego mercaptoetanol (14 mM) para neutralizar el hipoclorito sódico y se agitó unos minutos. Se lavaron muy bien de nuevo con agua destilada otras 2 ó 3 veces y se pusieron a crecer en NaCl 0.25 M, estéril, a 30°C con agitación continua. La eclosión suele producirse entre las 14 y las 20 horas de incubación. Transcurridas 24 horas, las nauplias se transfirieron a medio Dutrieu modificado (Batuecas et al., 1988), cambiándoles el medio cada 20-24 horas hasta el estadio deseado. En otros casos, los quistes se crecieron en agua de mar artificial (30 g/l de Marinemix, Aquaria). En ambos casos, todos los medios se suplementaron con gentamicina (50 µg/ml) para impedir la contaminación. Cuando las *Artemias* han llegado al estado de desarrollo deseado, se recogen por filtración.

2.2 Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.

Todas las técnicas básicas de biología molecular, como la ligación, subclonación, transformación, técnicas electroforéticas, transferencia de geles de DNA a membrana (Southern), marcaje radiactivo, etc., se realizaron tal y como se describe en Sambrook et al. (1989) y Ausubel et al. (1994).

2.3 Rastreo de genotecas.

En el caso de ambas genotecas genómicas, 7.5×10^5 ufp se transfirieron a filtros de nitrocelulosa que se prehibridaron e hibridaron con los fragmentos de cDNA marcados con α -

^{32}P] dCTP o bien con oligonucleótidos marcados con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (Sambrook et al., 1989). Las hibridaciones con las sondas de cDNA se efectuaron en: 50% formamida, 6x SSC, 1% SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de esperma de salmón sonificado y desnaturalizado y 5x Denhardt a 42°C. Los filtros se lavaron en 2x SSC, 0.1 % SDS, tres veces a 42 °C durante 30 minutos cada uno. Las hibridaciones en las que se utilizaron como sondas los oligonucleótidos, se llevaron a cabo en: 6x SSC, 0.5% SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de esperma de salmón sonificado y desnaturalizado, 1x Denhardt y 0.05% pirofosfato sódico, a 37°C. Los filtros se lavaron tres veces en 6x SSC, 0.1% SDS, 0.05% pirofosfato sódico a 37°C durante 30 minutos.

2.4 Obtención de ácidos nucleicos.

2.4.1 Aislamiento de DNA de bacteriófagos.

La obtención de DNA de fago en pequeña escala se hizo según Grossberger (1987), a partir de volúmenes de cultivo entre 10 y 15 ml. Alternativamente se empleó el Kit Magic Lambda Preps DNA Purification System (Promega). Para purificar grandes cantidades de fagos se empleó el método de centrifugación en gradiente de CsCl partiendo de 250 ml de cultivo (Sambrook et al., 1989). El DNA de los mismos se extrajo por el procedimiento descrito por Thomas y Davis (1974).

2.4.2 Aislamiento de DNA de plásmidos.

El aislamiento de DNA de plásmidos en pequeña escala se realizó alternativamente, con el método de Holmes y Quigley (1981) y con el Kit Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega) a partir de 1.5-10 ml de cultivo. Cuando se requirieron mayores cantidades de DNA, se empleó el método de gradiente de CsCl, partiendo de 250 ml de cultivo (Sambrook et al., 1989).

2.4.3 Aislamiento de RNA de *Artemia*.

Las nauplias de *Artemia* se crecieron hasta el estadio de desarrollo deseado. La extracción del RNA total se realizó por el método de Sherman et al. (1986), con la modificación de que la homogenización se llevó a cabo usando un Polytron y que la precipitación final del RNA se hizo en 3M LiCl a 4°C durante toda la noche. La concentración del RNA obtenido se calculó por espectrofotometría. Para obtener la fracción poliadenilada del RNA se realizó una cromatografía en oligo (dT)-celulosa (Sambrook et al., 1989).

2.5 Mapas de restricción.

Para localizar las dianas de restricción en los insertos contenidos en los vectores λ EMBL-3, se siguió el método de Rackwitz et al. (1984). Este método permite conocer el número de sitios de restricción y su distancia respecto a los extremos del vector mediante digestiones parciales e hibridaciones con oligonucleótidos complementarios a los extremos COS del fago λ , marcados radiactivamente. Los mapas de restricción se completaron con los datos obtenidos a partir de digestiones sencillas y dobles de los clones positivos con diferentes enzimas de restricción (*Eco* RI, *Sal* I, *Hind* III).

2.6 Análisis de Northern.

15 μ g de cada RNA se corrieron en geles de 1.5% Agarosa/2.2 M formaldehído (Sambrook et al., 1989), se transfirieron a membranas de nylon (ZetaProbe, Bio-Rad) y se hibridaron con los oligonucleótidos específicos que se mencionan en cada caso. Las condiciones de hibridación y lavado fueron las mismas que se han descrito para el rastreo de las genotecas genómicas.

2.7 Secuenciación y análisis de secuencias.

Los fragmentos genómicos, insertados en el vector pUC18, se secuenciaron a partir de los extremos con los oligonucleótidos universales (directo y reverso), o bien con los oligonucleótidos específicos, diseñados a partir de secuencias de cDNA o genómicas.

La secuenciación de DNA se realizó utilizando el método de los dideoxinucleótidos (Sanger et al., 1977), modificado por Chen y Seeburg (1985) para el empleo de DNA de doble cadena. Las enzimas empleadas fueron Sequenase (USB) o T7 DNA polimerasa (Pharmacia). Los productos de reacción se fraccionaron en geles termostatizados de poliacrilamida al 6%-7M urea en gradiente de grosor y/o en gradiente de tampón (Biggin et al., 1983), usando el sistema MacroPhor (LKB). Se ha utilizado así mismo, el secuenciador automático 373A DNA Sequencer, de Applied Biosystems. En este caso se utilizó la Taq DNA polimerasa y terminadores de cadena fluorescentes (Taq Dye-Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems).

El análisis de las secuencias se realizó mediante el programa Gene Jockey Sequence Processor (Biosoft). Las secuencias de las regiones reguladoras se analizaron con el programa MacPattern (Fuchs, 1991), comparándolas con las secuencias reguladoras contenidas en el banco de datos TFD (Ghosh, 1990).

2.8 PCR.

2.8.1 Amplificación de fragmentos de DNA.

La amplificación de fragmentos de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen de 100 μ l de solución tampón para la Taq DNA polimerasa, que contenía:

- DNA, 50 ng.
- Oligonucleótidos (específicos o generales del pUC18), 100 ng de cada uno.
- dNTPs, 0.2 mM de cada uno.
- 1U de enzima Taq polimerasa (BioTaq, BioProbe Systems).

Las amplificaciones se realizaron en un aparato Hybaid Omnigene. Los ciclos fueron los siguientes:

94°C/3 min; 55°C/2 min; 72°C/3 min
(94°C/1 min; 55°C/2 min; 72°C/3 min) x29 ciclos
94°C/1 min; 55°C/2 min; 72°C/10 min

2.8.2 PCR anclado.

Este protocolo permitió amplificar las regiones 5' de los mRNAs de la Act 302 y Act 403, cuyas secuencias eran desconocidas, ya que los cDNAs descritos estaban truncados en dichas posiciones (Macías y Sastre, 1990). El PCR anclado es una modificación de la técnica de PCR, que permite amplificar las secuencias 5' ó 3' de mRNAs incompletos. El protocolo que se usó básicamente se describe en Dorit Yale y Ohara (1993). RNA poli(A)⁺ de nauplias de 20 horas de desarrollo (100 ng) se anilló con el primer oligonucleótido específico (10 pg de oligonucleótido 13, complementario al clon pArAct 211 del nt 151 al 170), en 5 μ l de 0.2 M NaCl, 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA. Esta mezcla se incubó 3 minutos a 65°C para eliminar las posibles estructuras secundarias del mRNA que pudieran interferir en las síntesis del cDNA y posteriormente 4 horas a 40°C. Después de precipitar y resuspender el RNA con el oligonucleótido anillado en un volumen de 10 μ l, se inició la síntesis de la primera cadena de cDNA en un volumen de 25 μ l de solución tampón de la transcriptasa en reverso en presencia de 1 mM de cada dNTP, 0.5 μ g/ μ l BSA, 50 ng/ μ l de actinomicina D y 90 U de transcriptasa en reverso (Boehringer Mannheim). La reacción se incubó una hora a 37°C, se extrajo con fenol y se precipitó con etanol. Para añadir una cola poliG en el extremo 3' del cDNA, los productos de la reacción se resuspendieron en 10 μ l de solución tampón para el enzima conteniendo 0.75 mM cloruro de cobalto, 100 μ M dGTP y 25 U de transferasa terminal (Promega). Se incubó 30 minutos a 37°C, se precipitó con etanol y se resuspendió en 10 μ l de H₂O. Sobre la cadena de

cDNA con cola poliG, se realizó la primera amplificación por PCR. La reacción se realizó en 100 µl de solución tampón para la Taq DNA polimerasa, que contenía:

- cDNA poliG (1µl).
- 100 pmoles oligonucleótido poli (C) (Kasturi y Bona, 1994).
- 100 pmoles oligonucleótido específico 13.
- 0.15 mM de cada dNTP.
- 5 U de Taq DNA polimerasa (BioTaq, Bio-Probe Systems). Los ciclos efectuados

fueron;

(94°C/1.5 min; 42°C/2 min; 72°C/3 min) x 40 ciclos, en un aparato Hybaid Omnigene.

1 µl de la primera amplificación, se empleó para la segunda PCR. La mezcla de reacción de la 2ª PCR fue idéntica a la primera, excepto que el oligonucleótido 13, se sustituyó por el oligonucleótido 14 (complementario al clon pArAct 302 del nt 75 al 96), consiguiendo de este modo eliminar muchos positivos de la primera amplificación, que realmente no eran específicos. El resultado de la PCR se corrió en un gel de agarosa al 2%, y se purificó la banda de tamaño esperado, que se clonó en el vector pGEM-T (Promega). La secuenciación del inserto contenido en dicho plásmido con los oligonucleótidos universales (directo y reverso), permitió determinar la secuencia de las regiones 5' de los cDNAs de la Act 302 y Act 403, desconocida hasta ese momento.

2.9 Determinación del inicio de transcripción.

2.9.1 Extensión del cebador.

Los experimentos de extensión del cebador se hicieron según Triezenberg (1993). Se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

- Oligonucleótido 205: complementario al cDNA de la Act 211 del nucleótido 37 al 56.
- Oligonucleótido 305: complementario al cDNA de la Act 302 del nucleótido 36 al 55.
- Oligonucleótido 404: complementario al cDNA de la Act 403 del nucleótido 32 al 52.

Los oligonucleótidos empleados se marcaron con 100 µCi de [γ -³²P] ATP cada uno. 5 x 10⁵ cpm de estos oligonucleótidos, marcados radiactivamente, se hibridaron con 75 µg de RNA total de 20 horas de desarrollo de *Artemia*. El anillamiento se hizo en 30 µl de 1 M NaCl, 0.17 M Hepes pH 7.5 y 0.33 mM EDTA a 37°C, durante toda la noche. Los productos de la reacción se precipitaron con etanol y se resuspendieron en una mezcla de reacción de 30 µl de 20 mM cloruro magnésico, 10 mM DTT, 1.6 mM dNTPs, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 120 mM KCl y 50 U de transcriptasa en reverso (Boehringer Mannheim). Se incubó a 42°C/90 minutos. Los productos de la reacción se precipitaron con etanol y resuspendieron en 3 µl de TE y 3 µl de

tampón de carga (Promega). Los productos de extensión se analizaron en geles de poliacrilamida al 6 %-7 M urea. Como marcador se empleó un DNA de secuencia conocida, pudiendo así calcular el tamaño de los productos de extensión.

2.9.2 Protección a Nucleasa S1.

El inicio de transcripción para la isoforma Act 211 también se determinó mediante el ensayo de protección a Nucleasa S1, que se realizó según se describe en Gil et al. (1987). En este ensayo se utilizó un fragmento genómico amplificado por PCR. Los oligonucleótidos empleados en esta amplificación fueron el oligonucleótido 205 y el oligonucleótido directo del pUC18. El oligonucleótido 205 se marcó radiactivamente con 100 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, con la T4 Polinucleótido Kinasa (Boehringer Mannheim) antes de usarlo en la PCR. El fragmento de PCR se purificó, y 4×10^4 cpm se hibridaron con 75 μg de RNA de 20 horas de desarrollo de *Artemia*. Se incubó toda la noche a 37°C en 30 μl de la solución: 40 mM PIPES pH 6.4, 1mM EDTA, 0.4 M NaCl y 80% de formamida. Posteriormente se añadieron 10 volúmenes de tampón de la Nucleasa S1 (40 mM AcNa pH 4.6, 250 mM Clna y 4 mM ZnSO₄), y las cantidades de Nucleasa indicadas en cada caso. Se incubó la reacción 1 hora a 37°C, y se paró con 4 M AcNH₄ y 0.1 M EDTA. Después de extraer con fenol y cloroformo y precipitar con etanol, el producto de la reacción se resuspendió en 50 μl de TE. Se llevó a 75 mM de NaOH, con el fin de destruir el RNA, incubándose 10 minutos a 90°C. El producto de la reacción volvió a precipitarse con etanol y se resuspendió en 3 μl de TE y 3 μl de tampón de carga (Promega), analizándose en un gel al 8% de poliacrilamida-7M urea. Los controles se efectuaron con el fragmento genómico sin el tratamiento con Nucleasa S1 y con dicho fragmento hibridado con un RNA inespecífico (levadura). El fragmento marcado se degradó en los residuos de purina por el método de Maxam y Gilbert (1980), para usarlo como marcador e identificar así el tamaño del fragmento protegido.

2.10 Análisis filogenético.

El árbol filogenético se realizó con una selección de secuencias de actinas extraídas de la base de datos SWISS-PROT, Protein Sequence Database y con otras amablemente cedidas por el Dr. John Sparrow (actinas de *Drosophila melanogaster*). Para establecer el posible árbol filogenético estas secuencias se analizaron con el programa Clustal V (Higgins y Sharp, 1989), que usa el método de Saitou y Nei (1987).

2.11 Hibridaciones *in toto*.

Por hibridación *in toto* se entiende la visualización de la distribución tisular y celular de un determinado mRNA o bien de una proteína en animales enteros. Para llevar a cabo estos

experimentos se requiere una fijación y permeabilización previa del animal, que posibilite las reacciones posteriores de hibridación específica y detección.

2.11.1 Fijación y permeabilización.

Se crecieron las nauplias hasta el estadio de desarrollo deseado y se recogieron por filtración. Se llevaron a 4% paraformaldehído en PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1.4 mM KH_2PO_4 , pH 7.4), y se mantuvieron en agitación a 4° C durante toda la noche. Después de la fijación, se lavaron varias veces con PBT (PBS, 0.1% Tween-20), y de allí se deshidrataron progresivamente, lavándolas varias veces con metanol, hasta que la mayor parte de los pigmentos anaranjados habían desaparecido, lavándose luego exhaustivamente con PBT. La permeabilización se llevó a cabo mediante una suave sonicación de las nauplias fijadas. Este tratamiento físico de rotura de la cutícula quitinosa requiere llegar a un compromiso entre la integridad aparente de la morfología de las nauplias y la aparición de roturas que permitiesen el acceso de la sonda y, sobre todo, del anticuerpo. Para conseguir las condiciones óptimas, se ensayaron diferentes tiempos y potencias observando posteriormente las nauplias al microscopio. La sonicación se realizó en un aparato de punta de inmersión (Soniprep 150-MSE) a una potencia de 3 micrones, durante 4 ciclos de 4 segundos cada uno. Después de la permeabilización física, las nauplias se refijaron en 4% paraformaldehído en PBS durante 1 hora, se lavaron en PBT y se trataron con proteinasa K (50 µg/ml en PBT) durante 15 minutos. Esta reacción enzimática se paró con 2 mg/ml de glicina en PBT y se refijó por segunda vez con paraformaldehído en las mismas condiciones durante una hora.

2.11.2 Hibridación con oligonucleótidos.

Para la detección de los mRNAs de las actinas se usaron protocolos ya descritos para otros organismos con ligeras modificaciones para adaptarlos a las condiciones específicas de *Artemia* (Tautz y Pfeifle, 1989; Wilkinson, 1992; Scott Young III, 1992 y Hemmati-Brivanlou et al., 1990).

Los oligonucleótidos usados para cada isoforma correspondían a regiones complementarias a los cDNAs en zonas 3' no traducidas que no presentan homología con otras isoformas. Estos oligonucleótidos fueron : el oligonucleótido 2 de la Act 211, el oligonucleótido 3 de la Act 302, y el oligonucleótido 4 de la Act 403, cuyas características ya se detallaron anteriormente (Materiales 1.3.2.2). Estos oligonucleótidos se marcaron con digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim) según Scott Young III (1992), empleando la transferasa terminal (Promega). Las nauplias se prehibridaron en 500 µl de 6 x SSC, 5x Denhardt, 500 µg/ml de esperma de salmón sonificado y desnaturalizado, 50 µg/ml de heparina y 0.1% de SDS a 45°C,

durante al menos 2 horas. La hibridación se llevó a cabo en 500 µl del mismo tampón, incluyendo 100 ng de oligonucleótido marcado, durante 15 horas a 45°C. El lavado de las nauplias se hizo también a 45°C, en mezclas de hibridación y PBT en las proporciones 4:1, 3:2, 2:3, 1:4.

2.11.3 Detección.

La detección de la sonda hibridada se realizó usando el Kit DIG DNA Labelling y Detection Nonradiative, Boehringer Mannheim. El anticuerpo se preadsorbió durante un mínimo de 2 horas a 4° C, con nauplias fijadas, pero no hibridadas con las sondas, con el fin de eliminar reacciones inespecíficas. Este anticuerpo, ya preadsorbido, se incubó con las nauplias en un volumen de 500 µl de la dilución 1:1000 en PBT durante toda la noche, a 4°C y en agitación orbital. Posteriormente se hicieron varios lavados con PBT (3 veces durante 20 minutos) y con el tampón de la fosfatasa alcalina (tampón de revelado: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM cloruro magnésico, pH 9.5 y 1 mM levamisol para inhibir las fosfatasas alcalinas endógenas). Las nauplias se revelaron añadiendo a este tampón de revelado 4.5 µl de NBT y 3.5 µl de X-fosfato (incluidos en el Kit) /ml. La reacción se mantuvo en la oscuridad para que desarrollara el color. Cada media hora aproximadamente se visualizó al microscopio una alícuota de las nauplias y cuando se llegó a un compromiso entre la señal específica y el fondo, se pararon las reacciones con PBT. El tiempo normal de revelado fue de 2-3 horas.

2.11.4 Montaje, microscopía y fotografía.

Las nauplias se deshidrataron a través de lavados sucesivos de 30 minutos en las siguientes diluciones de etanol: 25%, 50%, 75% y 100%. Posteriormente se trataron con xileno y se montaron en Bálsamo de Canadá (Sigma) o Eukitt. Este tratamiento mejora considerablemente la relación señal/fondo inespecífico. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio Zeiss Axiophot y se fotografiaron con películas Kodacolor VR 100.

La tinción de los núcleos se realizó con H33258 (1 µg/ml durante 10 minutos), seguida de un lavado en PBT durante 5 minutos. El montaje posterior fue idéntico al ya descrito. Esta tinción nos permitió conocer la organización celular y confirmar la integridad de los tejidos. Se visualizó con fluorescencia en el microscopio mencionado.

RESULTADOS

RESULTADOS.

1. EXPRESION DE TRES ISOFORMAS DE ACTINA EN *Artemia*.

1.1 Expresión temporal.

Se han determinado las variaciones en los niveles de expresión de tres diferentes isoformas de actina con objeto de conocer cuando se reanuda la transcripción génica después de la activación del quiste y conseguir información de los mecanismos que regulan la activación de la transcripción en *Artemia franciscana*. El problema se abordó de este modo, ya que no es posible conseguir esta información a través de métodos más directos, como un marcaje metabólico, debido a la impermeabilidad del quiste (de Chaffoy et al., 1978).

Para llevar a cabo dicho estudio se crecieron embriones enquistados de *Artemia* durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 26 horas. Se extrajo su RNA y se determinó el nivel de expresión de los diferentes mRNAs por medio de una hibridación con los oligonucleótidos específicos para cada isoforma : oligonucleótido 2 para la Act 211, oligonucleótido 3 para la Act 302 y oligonucleótido 4 para la Act 403 (Macías y Sastre, 1990). Para cuantificar los datos obtenidos, los autorradiogramas de tres membranas hibridadas con cada sonda específica, se midieron por densitometría. Estos valores se corrigieron, dividiendo por la cantidad relativa de rRNA aplicado en cada pocillo (determinado por tinción con bromuro de etidio) ya que, según Koller et al. (1987), la cantidad de rRNA por célula es constante en *Artemia* durante este período del desarrollo. Los valores obtenidos para cada muestra se dividieron entre la señal media de todas las muestras en cada membrana. Los datos normalizados se emplearon para determinar los valores medios de los tres autorradiogramas para cada tiempo de desarrollo, así como para calcular las desviaciones estándar que se muestran en las figuras 1, 2 y 3.

La expresión de las tres isoformas de actina que se han caracterizado en este trabajo (Act 211, Act 302 y Act 403) se induce durante el desarrollo embrionario de *Artemia*. La cuarta isoforma caracterizada en *Artemia*, Act 205, (Macías y Sastre, 1990) se expresa a niveles mucho más bajos que las otras isoformas y su expresión es constante a lo largo del desarrollo, por lo que no se ha continuado su estudio en esta Tesis. Los resultados obtenidos en las hibridaciones de los geles de RNA con los oligonucleótidos específicos para cada isoforma se presentan en las figuras 1, 2 y 3 (correspondientes a los genes Act 211, Act 302 y Act 403 respectivamente). En la parte superior de las figuras se muestra la hibridación obtenida con el oligonucleótido correspondiente, en la parte central, la tinción del gel con bromuro de etidio, y en la parte inferior, los valores medios obtenidos después de la cuantificación de tres membranas hibridadas con el oligonucleótido específico.

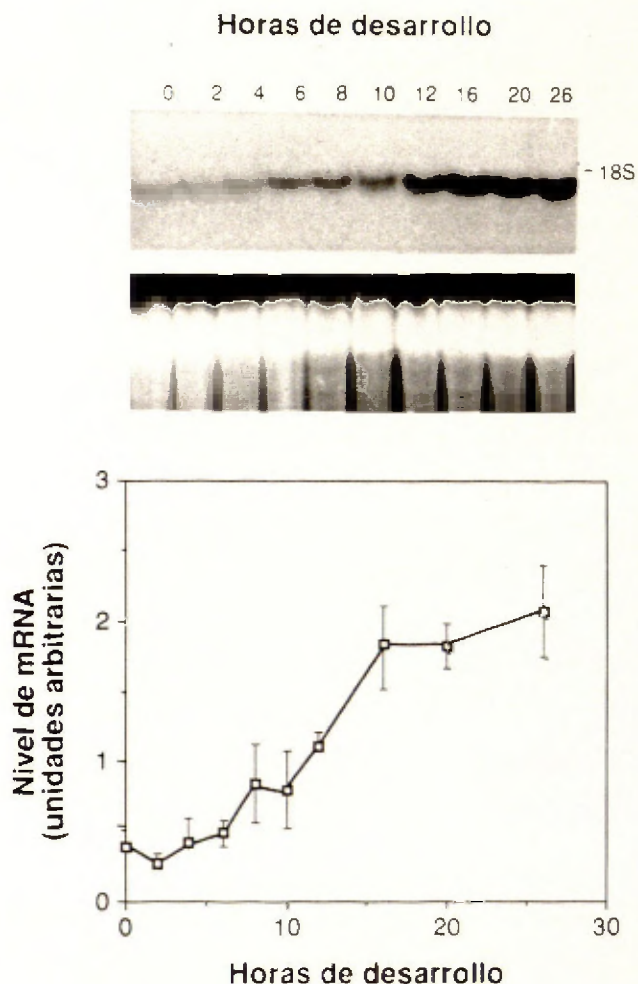


Figura 1: Expresión del mRNA de la isoforma Act 211 durante el desarrollo.

Quistes criptobióticos de *Artemia* se hidrataron y cultivaron durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 26 horas. Se aisló RNA total de cada población y se analizaron 15 µg en geles 2.2M formaldehído-1.5% agarosa. Estos geles se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con la sonda específica para la isoforma Act 211 (oligonucleótido 2). En la parte superior de la figura se muestra la hibridación obtenida con el oligonucleótido específico. Se indica el lugar de migración del RNA ribosómico 18S de rata, usado como marcador. En la parte central se presenta la tinción del gel con bromuro de etidio. En la parte inferior de la figura se representa la media de los valores obtenidos después de la cuantificación de tres membranas hibridadas con el oligonucleótido 2. Las barras representan las desviaciones estándar de los valores.

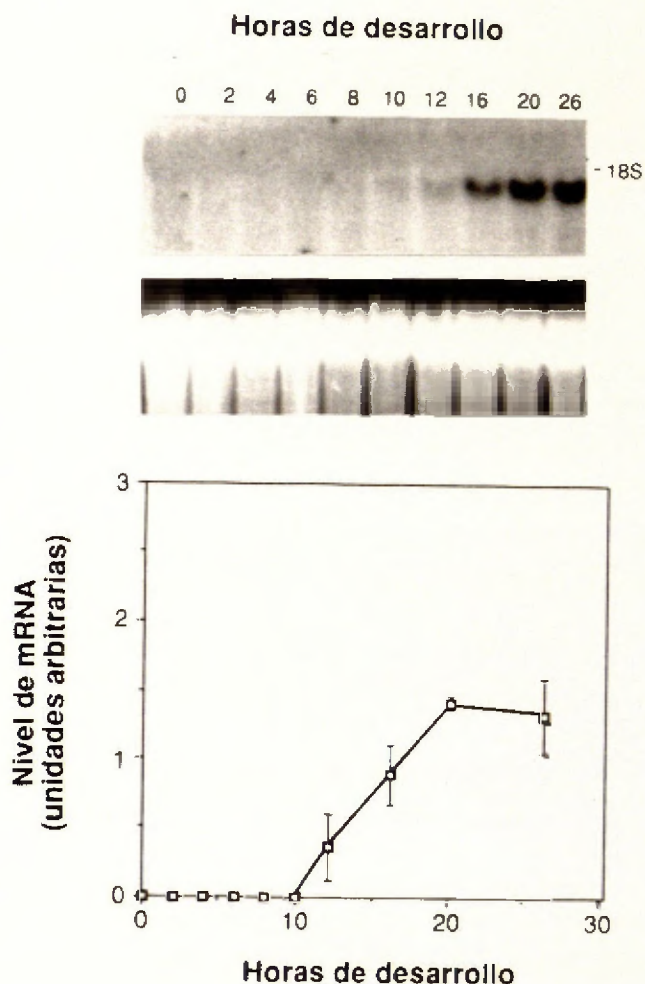


Figura 2: Expresión del mRNA de la isoforma Act 302 durante el desarrollo.

Quistes criptobióticos de *Artemia* se hidrataron y cultivaron durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 26 horas. Se aisló RNA total de cada población y se analizaron 15 μ g en geles 2.2M formaldehído-1.5% agarosa. Estos geles se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con la sonda específica para la isoforma Act 302 (oligonucleótido 3). En la parte superior de la figura se muestra la hibridación obtenida con el oligonucleótido específico. Se indica el lugar de migración del RNA ribosómico 18S de rata, usado como marcador. En la parte central se presenta la tinción del gel con bromuro de etidio. En la parte inferior de la figura se representa la media de los valores obtenidos después de la cuantificación de tres membranas hibridadas con el oligonucleótido 3. Las barras representan las desviaciones estándar de los valores.

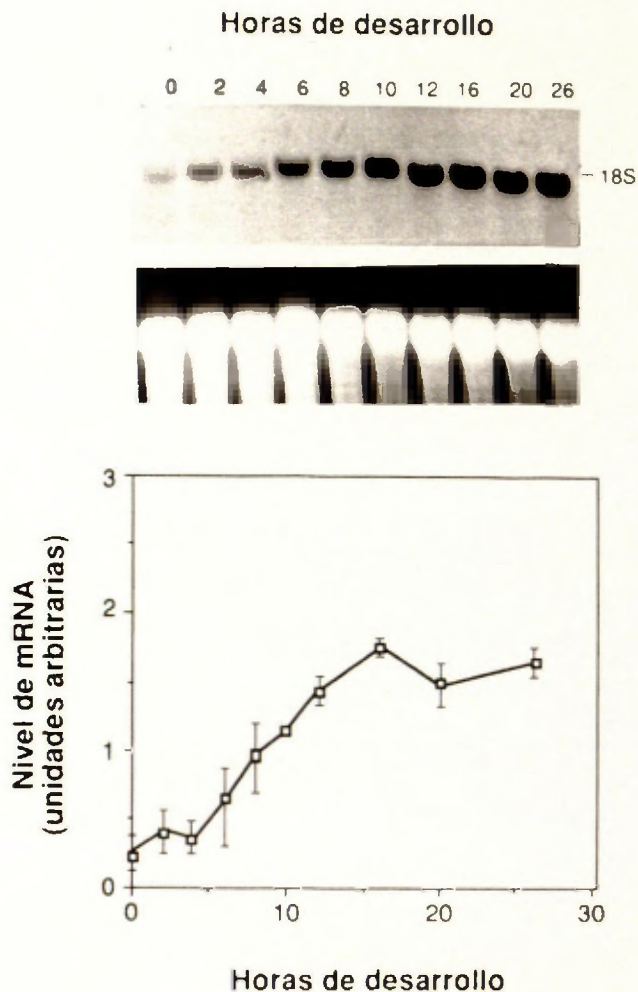


Figura 3: Expresión del mRNA de la isoforma Act 403 durante el desarrollo. Quistes criptobióticos de *Artemia* se hidrataron y cultivaron durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 26 horas. Se aisló RNA total de cada población y se analizaron 15 µg en geles 2.2M formaldehído-1.5% agarosa. Estos geles se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con la sonda específica para la isoforma Act 403 (oligonucleótido 4). En la parte superior de la figura se muestra la hibridación obtenida con el oligonucleótido específico. Se indica el lugar de migración del RNA ribosómico 18S de rata, usado como marcador. En la parte central se presenta la tinción del gel con bromuro de etidio. En la parte inferior de la figura se representa la media de los valores obtenidos después de la cuantificación de tres membranas hibridadas con el oligonucleótido 4. Las barras representan las desviaciones estándar de los valores.

Según estos resultados, los mRNAs que codifican para las Act 211 y Act 403 están presentes a niveles bajos en el quiste y se inducen durante el desarrollo embrionario. La expresión de la Act 211 (Figura 1) se incrementa después de las 6 horas de desarrollo, con el principal aumento observado entre las 10 y las 16 horas. El nivel de la Act 403 (Figura 3) se incrementa muy temprano en el desarrollo, de hecho, un aumento pequeño pero reproducible puede ya observarse en las 2 primeras horas, aunque el principal ocurre entre las 4 y las 16 horas.

El RNA que codifica para la Act 302 (Figura 2) no está presente en el quiste y no se expresa a niveles detectables hasta las 12 horas de desarrollo. Los niveles de expresión para esta isoforma se incrementan linealmente entre las 12 y las 20 horas de desarrollo, tiempo en el que se alcanzan los valores máximos. Posiblemente la activación de la transcripción de este gen sea dependiente de diferenciación de tejido, por lo que su expresión no sería simultánea con el resto de genes expresados en todas las células (ver apartado 1.2 de la Tesis).

1.2 Expresión tisular: *in toto* .

La expresión de cada isoforma de actina, como acabamos de ver, esta diferencialmente regulada en el tiempo. En otros organismos, la expresión de isoformas de actina también está regulada en el espacio, ya que todas ellas muestran una expresión tisular característica. La expresión de las isoformas de actina está muy bien establecida en vertebrados (Vandeckerckhove y Weber, 1978 y 1979). En invertebrados, el modelo de expresión tisular es diverso y bastante menos conocido. Ha sido descrito sobre todo para los insectos *Drosophila* (Fyrberg et al., 1983), y *Bombix mori* (Mounier y Prudhomme, 1991), pero existe un gran vacío en otros muchos grupos de invertebrados. Debido a esta carencia y al interés que puede suponer en los estudios de filogenia, se inició el análisis de la familia génica de las actinas en el crustáceo *Artemia franciscana*, como especie representativa de este grupo de Artrópodos.

Para abordar su estudio se puso a punto la técnica de hibridación *in toto*, ya descrita para otros organismos (Tautz y Pfeifle, 1989; Wilkinson, 1992; Scott Young III, 1992 y Hemmati-Brivanlou et al., 1990), pero modificando y adaptando los protocolos a las condiciones morfológicas de *Artemia*, según se detalla en el punto 2.11 de los Materiales y Métodos. Ha sido preciso optimizar todo tipo de condiciones (concentraciones, tiempos, métodos de permeabilización, métodos de manipulación de las nauplias, etc.). El protocolo en síntesis consiste en permeabilizar las nauplias, sin alterar su morfología externa e interna (se requiere una buena fijación) y permitir de este modo el acceso de la sonda y, sobre todo, del anticuerpo. En la realización de este estudio existe de nuevo, el problema de la posible hibridación cruzada entre las isoformas de actina. Por este motivo hemos empleado las siguientes sondas:

- cDNAs completos de cada una de las isoformas.
- Oligonucleótidos específicos complementarios a las regiones 3' no traducidas de las isoformas.
- Ribosondas sintetizadas también a partir de las regiones 3' no traducidas.
- Fragmentos de cDNA, de aproximadamente 200 pb, correspondientes a las regiones 3' no traducidas, en el caso de las actinas 211 y 403.

Los resultados obtenidos utilizando larvas de 65 horas de desarrollo se muestran en la figura 4. Los mejores resultados han sido obtenidos con los oligonucleótidos específicos ya utilizados en los Northern-blot. El empleo de los cDNAs completos como sondas no permitió establecer diferencias entre las 3 isoformas sino que, al contrario, se observó una hibridación cruzada entre ellas (Fig. 4f).

En la fotografía 4a se presenta una hibridación *in toto* con el oligonucleótido 2 correspondiente a la Act 211. Esta isoforma parece expresarse de forma generalizada en la mayor parte de los tejidos de la larva pero no en tejido muscular. Según estos resultados, la Act 211 podría considerarse una isoforma citoplásmica, de expresión ecto y mesodérmica.

La fotografía 4b muestra una nauplia, del mismo estadio de desarrollo, hibridada con el oligonucleótido 3 correspondiente a la Act 302. Esta actina parece expresarse exclusivamente en las fibras musculares de las antenas y mandíbulas, que forman el sistema muscular mandibular y natatorio de la nauplia. La aparición de tinción inespecífica en el tubo digestivo se debe a la existencia de fosfatasas endógenas. El tampón de revelado para este sistema de fosfatasas alcalinas contiene levamisol, inhibidor de fosfatasas endógenas, que no actúa sobre las del tracto digestivo. Como consecuencia, el tubo digestivo apareció teñido siempre, en mayor o menor medida. La fotografía 4c muestra un detalle ampliado de la antena de una nauplia hibridada con el oligonucleótido 3 de la Act 302, en el que se pueden observar las fibras musculares teñidas que se dirigen desde la cabeza al extremo de dichos apéndices.

En la fotografía 4d se presenta una nauplia hibridada con el oligonucleótido 4 de la Act 403. Al igual que ocurría con la Act 211, la Act 403 presenta una hibridación generalizada de la nauplia, no expresándose en las fibras musculares. Estos datos sugieren que es una isoforma citoplásmica. A diferencia de la Act 211, la Act 403 parece expresarse preferentemente en la región ectodérmica de las nauplias.

Finalmente, las fotografías 4e y 4f son los controles correspondientes: la nauplia 4e es un control negativo, al que no se le añadió sonda, y la 4f una nauplia hibridada con un cDNA completo (Act 403) marcado también con digoxigenina, como en el caso de los

Figura 4: Hibridaciones *in toto* de nauplias de *Artemia* con sondas específicas de genes de las isoformas de actina Act 211, Act 302 y Act 403. Los quistes de *Artemia* se crecieron durante 65 horas y las nauplias obtenidas se recogieron, fijaron e hibridaron tal y como se describe en el apartado 2.11 de Materiales y Métodos. El panel **a** muestra los resultados de la hibridación con el oligonucleótido 2, correspondiente a la Act 211, el panel **b** los de la hibridación con el oligonucleótido 3, correspondiente a la Act 302, el panel **c** los obtenidos con el oligonucleótido 3, en una imagen ampliada (63x) y el panel **d** los de la hibridación con el oligonucleótido 4, correspondiente a la Act 403. El panel **e** corresponde a una nauplia a la que no se le añadió sonda y el panel **f** corresponde a una nauplia hibridada con un cDNA completo (pArAct 403) marcado también con digoxigenina. Las imágenes de los paneles **a**, **b**, **d**, **e** y **f** se obtuvieron con un objetivo de 20 aumentos.

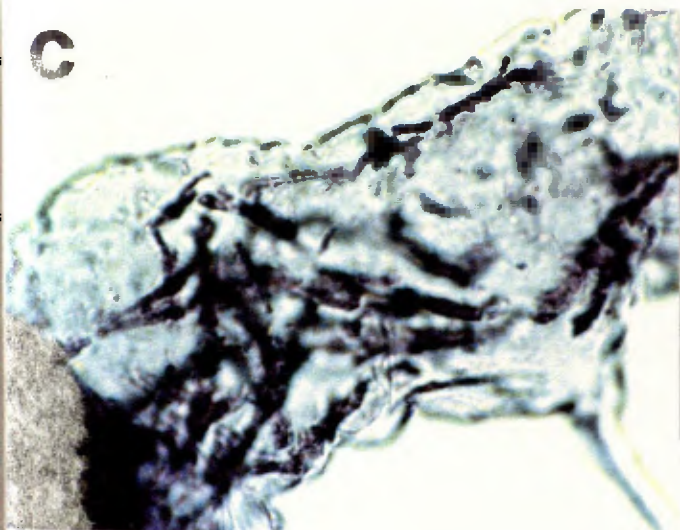
a



b



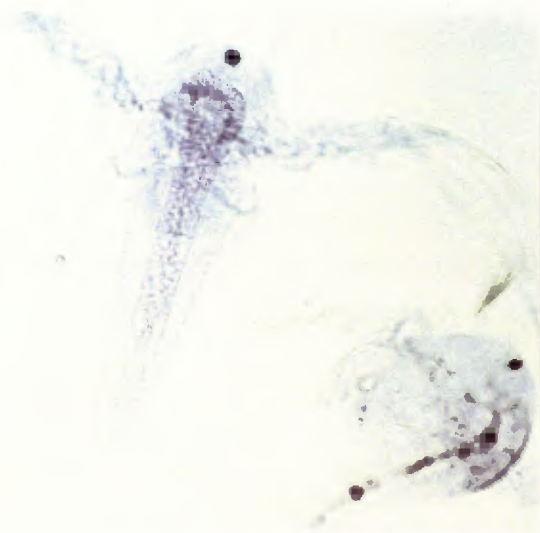
c



d



e



f



oligonucleótidos. Debido a que la homología de secuencia de nucleótidos es de aproximadamente un 80% (Macías y Sastre, 1990), la hibridación con uno cualquiera de los cDNAs completos debería producir una reacción cruzada, en la que se visualizaran las tinciones de todas y cada una de las isoformas. Eso es lo que se observa en la fotografía 4f, donde aparece una hibridación citoplásmica ectodérmica propia de la Act 403, una hibridación citoplásmica mesodérmica característica de la Act 211 y además las fibras musculares de las antenas aparecen claramente teñidas a lo largo de todo el apéndice, como ocurre en el caso de la Act 302 caracterizada como muscular.

Conforme a estos resultados, de las tres isoformas de actina estudiadas, dos de ellas tendrían una expresión citoplásmica (Act 211 y Act 403) y la tercera, Act 302, una expresión muscular. Estos datos de expresión tisular coincidirían con los resultados ya descritos de expresión temporal de dichas isoformas, ya que la Act 302 (muscular), comienza a expresarse a partir de las 10-12 horas de desarrollo, precisamente cuando se observan por primera vez neuronas diferenciadas y células musculares mediante métodos histoquímicos (Raineri, 1989).

2. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LOS GENES DE LAS TRES ISOFORMAS DE ACTINA EN *Artemia*.

El estudio de la expresión de las tres isoformas de actina muestra que son genes con distinta especificidad de tejido y cuya expresión se regula durante el desarrollo. Estas características hacen que sean genes interesantes para estudiar los mecanismos, espaciales y temporales, que regulan su transcripción durante este período del desarrollo. Un paso imprescindible en este estudio es el aislamiento de las regiones promotoras que regulan la transcripción. Para ello se ha procedido al aislamiento y caracterización de clones genómicos en los que estuvieran incluidas dichas regiones. El aislamiento de clones genómicos ha permitido también conocer la estructura de intrones y exones de estos genes, dato de interés evolutivo, como veremos más adelante.

La homología existente entre las isoformas de actina, ya mencionada anteriormente, permitió unificar las primeras etapas del aislamiento de clones genómicos para las tres isoformas. El primer rastreo se realizó en la genoteca genómica de *Artemia* de la que se disponía en aquel momento en el laboratorio (Franco et al., 1994) con el cDNA completo pArAct211 en condiciones poco restrictivas. En este primer paso se obtuvieron fagos que contenían los genes codificantes para las diversas isoformas de actina. Posteriormente se usaron sondas específicas de cada isoforma, tales como los oligonucleótidos complementarios a las regiones 3' no traducidas descritas anteriormente, para identificar los fagos específicos para cada una de ellas.

En algunos casos los fagos obtenidos no contenían el gen completo y fue necesario aislar nuevos fagos solapantes. Estos nuevos fagos se aislaron a partir de una segunda genoteca genómica construida a partir de una población homogénea de *Artemia franciscana* (Escalante y Sastre, 1993). Los estudios realizados con los primeros fagos y otros estudios realizados con la primera genoteca habían mostrado que contenía una mezcla de fagos correspondientes a dos especies distintas de *Artemia*, *Artemia franciscana* y *Artemia partenogenética*, por lo que fue necesario construir la nueva genoteca genómica. La obtención de fagos solapantes de esta segunda genoteca se realizó ya usando sondas específicas para aquellas isoformas en que fue necesario.

2.1 Actina 211.

2.1.1 Mapa físico.

Con objeto de aislar clones genómicos para la Act 211 de *Artemia*, se efectuó un rastreo en una librería sintetizada en λ EMBL-3 (Franco et al., 1994) como se indicó anteriormente. 7.5×10^5 ufp se transfirieron a nitrocelulosa y se hibridaron con el clon de cDNA ya caracterizado, pArAct211 (Macías y Sastre, 1990). Los fagos positivos obtenidos se hibridaron con el oligonucleótido específico 2, complementario al clon pArAct211 de los nucleótidos 1310 al 1329. Se obtuvieron de este modo 3 clones positivos, entre los que se eligió el más largo (λ gArAct26) que incluía el gen en su totalidad. Una vez aislado, amplificado y purificado, tal y como se indica en el apartado 2.4.1 de los Materiales y Métodos, se elaboró su mapa físico (Figura 5) mediante digestiones sencillas y dobles con tres enzimas de restricción (*Eco* RI, *Hind* III y *Sal* I). Simultáneamente, se siguió el método descrito por Rackwitz et al. (1984) para obtener mapas de restricción de genes clonados en el fago λ : productos parciales de digestión de los clones se hibridan con oligonucleótidos marcados radiactivamente complementarios al extremo cos de cadena sencilla. Después de una electroforesis en un gel de agarosa y una autorradiografía, los mapas físicos se determinan directamente a partir de la escalera de productos de digestión parcial.

Los distintos fragmentos de restricción se subclonaron mediante una digestión del DNA del fago y una digestión y defosforilación del vector pUC18 con las enzimas correspondientes, seguida de una ligación y transformación en la cepa de *Escherichia coli* NM522. La secuenciación y análisis de secuencias se realizó según se describe en el punto 2.7 de los Materiales y Métodos. Además de los cebadores universales del pUC18, se emplearon oligonucleótidos específicos. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados de acuerdo con la secuencia del cDNA y se utilizaron para localizar y secuenciar los exones en los clones

genómicos. Las primeras secuencias con los cebadores del pUC18 permitieron determinar la posición de algunos exones. Esta información se utilizó para sintetizar nuevos oligonucleótidos de las zonas 5' de los siguientes exones, conduciendo a su localización y secuenciación. Posteriormente se sintetizaron oligonucleótidos complementarios a los intrones, próximos a las regiones 3' de los exones, para secuenciar la cadena complementaria.

En la Figura 5 se presenta el mapa físico del gen de la Act 211, indicándose la posición de las dianas de restricción y de los exones (las cajas blancas corresponden a las zonas codificantes de dichos exones y las cajas negras a las no codificantes). Este gen consta de 4 exones de tamaños muy variados, desde 55 pb el más pequeño a 801 pb el mayor. Los exones están separados por 3 intrones, siendo el primero el mayor (6.8 kb), situado en la región 5' no traducida. Los otros 2 se sitúan en regiones traducidas. Este gen presenta un primer exón de

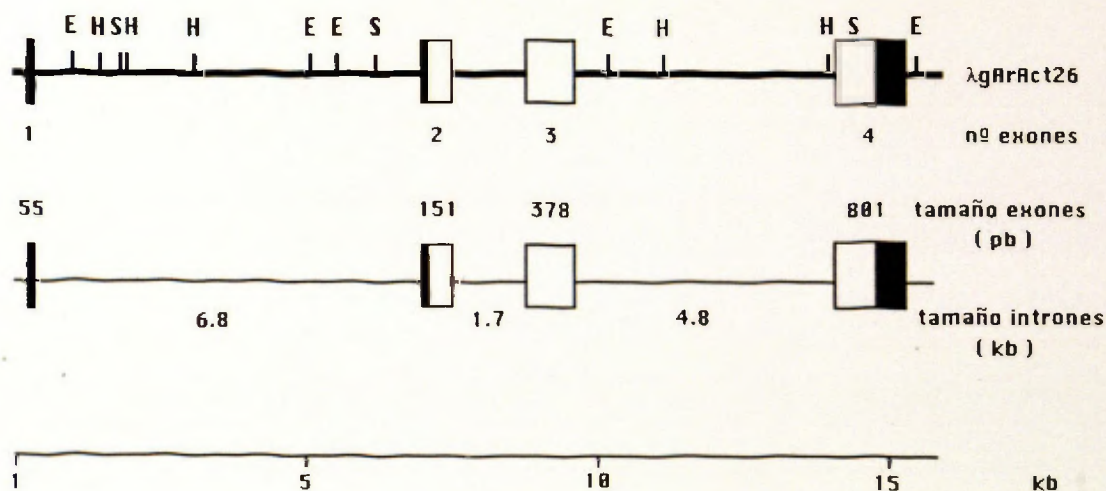


Figura 5: Estructura del clon genómico λ gArAct26 correspondiente a la isoforma Act 211. En la parte superior de la figura se representa el mapa físico del clon genómico λ gArAct26, el cual contiene el gen completo de la isoforma Act 211 de *Artemia*. Se señala la posición de las dianas de restricción para tres diferentes enzimas, *Eco* RI (E), *Sal* I (S) y *Hind* III (H). También se indica la situación en este fago de los exones (cajas blancas para las regiones codificantes y negras para las no codificantes). En la parte central se presenta un esquema indicando el tamaño de los exones e intrones. En la parte inferior se representa el tamaño en kb de la región genómica analizada que cubre el gen completo.

pequeño tamaño en la región 5' no codificante del mRNA. Como se verá más adelante también en las otras 2 isoformas de actina de *Artemia* existe un pequeño exón en la región 5' no traducida. Desde el extremo del clon genómico hasta el primer exón existe una distancia de 610 pb que se secuenciaron en su totalidad para el estudio de sus regiones reguladoras, como se describirá posteriormente (apartado 3.2 de Resultados).

A

Oligo	Situación	nt inicial	Secuencia (5'-3')	nt final
2	cDNA	1329	GAT CTA GAT ACA GGA GCC CT	1310
13	cDNA	170	GCA CGT GGG GCA TCA TCT CC	151
43	cDNA	878	GAT GGC TGG AAG AGG GCT TC	859
65	cDNA	1075	GCC CCA CCT GAG CGT AAA TAC	1095
201	cDNA	34	GGA GTC CAT AGT TTA CTT CA	53
202	Intrón 1	114	CCT CTA ACG GTC ACC TCG TC	95
203	cDNA	197	GGT CGG CCA ACT ATT GAG GG	178
204	Intrón 1	-87	CCC AAG CTC TTG GAT GGT C	-69
205	cDNA	56	CCT TGA AGC AAA CTA TGG AC	37

B

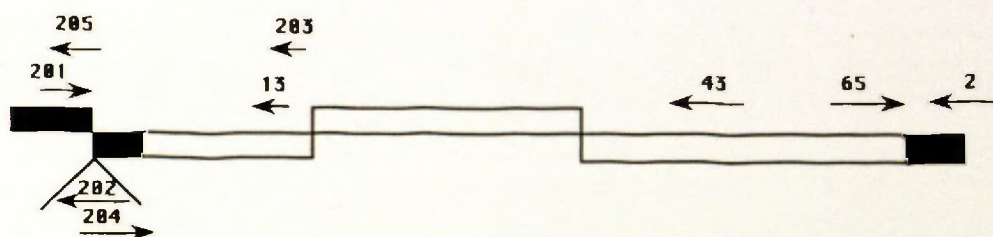


Figura 6: Oligonucleótidos diseñados para el aislamiento y caracterización de clones genómicos correspondientes a la isoforma Act 211 de *Artemia*. A) Oligonucleótidos empleados para el aislamiento, secuenciación y caracterización de la isoforma Act 211. Todos se han numerado en sentido 5'-3', indicando el nucleótido inicial y final, asignando como primera base el posible inicio de transcripción para los que están situados en el cDNA o en el promotor. Los oligonucleótidos situados en intrones se han numerado a partir de la primera base del extremo 5' del intrón (valores positivos) o la última del extremo 3' (valores negativos). B) Situación de los oligonucleótidos sobre una representación esquemática de los exones constituyentes de la isoforma de actina 211. Las cajas blancas corresponden a regiones codificantes y las negras a las no codificantes. Los oligonucleótidos 202 y 204 se sitúan en el primer intrón.

Los oligonucleótidos diseñados para la Act 211 se muestran en la Figura 6A. Se indica la región del gen a la que son complementarios asignando como primera base el posible inicio de transcripción situado más 5' para los que están situados en el cDNA o en el promotor. Los oligonucleótidos situados en intrones se han numerado a partir de la primera base del intrón, dando valores negativos para aquellos intrones situados en posiciones 5' del exón. En la Figura 6B se muestra la situación de estos oligonucleótidos sobre los exones correspondientes o en el primer intrón como es el caso de los oligonucleótidos 202 y 204.

2.1.2 Variaciones de secuencia del DNA genómico respecto al cDNA.

Como ya se ha indicado con anterioridad, el clon genómico que contiene la isoforma Act 211 (λ gArAct26) se obtuvo en un rastreo de una genoteca en λ EMBL-3, que contenía una mezcla de poblaciones entre *Artemia franciscana* y *Artemia parthenogenética diploidica* (Franco et al., 1994). Esta característica produjo la aparición de gran cantidad de cambios entre la secuencia de nucleótidos del cDNA obtenido de *Artemia franciscana* y la del DNA genómico, que se detallan en la Figura 7.

			Exón 1	Exón 2	Exón 3	Exón 4	
Zonas no codificantes (5'y3')	nt	Transiciones		1/55	1/26	—	8/176
		Transversiones		0	3/26	—	2/176
Zonas codificantes	nt	Transiciones		—	3/125	16/378	12/625
		Transversiones		—	1/125	5/378	7/625
	aa	Cambios sinónimos		—	4/41	20/126	17/208
		Cambios no sinónimos	Cambios conservativos	—	0	1/126	0
			Cambios no conservativos	—	0	0	2/208

Figura 7: Cambios en la secuencia del fago genómico λ gArAct26 respecto al cDNA de la isoforma Act 211 de *Artemia*. En la tabla se presenta el resultado del análisis comparativo entre las secuencias del DNA del clon genómico λ gArAct26 y el cDNA pArAct211. En las regiones codificantes y no codificantes (5' y 3') se analizan los dos diferentes tipos de cambios de nucleótidos, transiciones y transversiones. En las regiones codificantes se estudian además los cambios correspondientes a los aminoácidos, cambios sinónimos y no sinónimos, y entre estos últimos los conservativos y no conservativos. En todos los casos se indica en el denominador el número total de nucleótidos o aminoácidos comprendidos en la región comparada.

El análisis se realizó exón por exón, tanto en las regiones codificantes como en las no codificantes (5' y 3'). Se han diferenciado los cambios de nucleótidos que implican transiciones (purinas por purinas o pirimidinas por pirimidinas) y los que implican transversiones (purinas por pirimidinas o pirimidinas por purinas). En ambos casos se han referido al número total de nucleótidos de la región comparada. En las regiones codificantes se han identificado además 2 tipos de cambios (sinónimos y no sinónimos), según se describe en Li y Graur (1991). Los cambios sinónimos son aquellos que no implican cambio de aminoácido y los no sinónimos los que sí lo implican. A su vez dentro de estos últimos, se encontraron cambios conservativos (aminoácidos polares por polares, etc.) y cambios no conservativos. Resumiendo, se pudo concluir que las transiciones eran mucho más abundantes que las transversiones y que prácticamente todos los cambios de aminoácidos eran sinónimos (el cambio de nucleótido no producía cambio en el aminoácido, como era esperable en un gen de secuencia codificante tan conservada).

A pesar de su carácter conservativo, el número de cambios de nucleótidos es muy alto (4.26%), como podrá comprobarse comparativamente con los cambios observados en las isoformas obtenidas a partir de la genoteca constituida por una población homogénea de *Artemia franciscana*. Este análisis muestra la variabilidad genética de *Artemia*, incluso en genes que se han conservado tan bien a lo largo de toda la evolución como es el caso de las actinas, debido a que *Artemia* es un organismo que acumula mutaciones a una velocidad relativamente alta (Field et al., 1988).

2.1.3 Secuencias flanqueantes intrón-exón.

Las características de las regiones límite intrón-exón se resumen en la Figura 8, donde se detalla el tamaño de cada exón y de cada intrón, así como las secuencias de unión entre ambos. Cuando el intrón interrumpe la finalización de un triplete se designa mediante puntos. En este caso, el segundo intrón no interrumpe el triplete porque se localiza entre el aminoácido 41 y el 42. El tercer intrón, sin embargo, interrumpe el aminoácido 168 en la primera posición del triplete. La mayor parte de los intrones descritos en las actinas conocidas, interrumpen la fase de lectura en la primera o tercera posición, como ocurre con estos dos intrones. La interrupción en fase dos es menos frecuente (sólo se han descrito 5 casos de las 40 posiciones diferentes identificadas en genes de actinas).

Un estudio de las secuencias límite intrón-exón demuestra que todas ellas se ajustan a los cánones establecidos descritos para otros organismos (Shapiro y Senapathy, 1987 y Senapathy et al., 1990), tanto en la región intrónica como en los nucleótidos que limitan los intrones y forman parte constituyente de los exones. Las secuencias originadas tras la

nº Exón	S. aceptora	Secuencia codificante	S. donadora	T. exón	T. intrón
1		AGATTAGTC-----TACTTCAG	gtatgagat	55pb	6.8 kb
2	ctgttgcag	GGTCAATA-----CGT CAT CAG A H Q 41	gtactgagc	151 pb	1.7 kb
3	tttccttag	GGT GTC ATG-----TAT GAA G . . G U M Y E G 42 168	gtatgttac	378 pb	4.8 kb
4	tcagatcag	. GT TAT GCC-----3' poly A G Y A 168		881 pb	

Figura 8: Secuencias flanqueantes de las uniones intrón-exón en la isoforma Act 211 de *Artemia* . En la parte central se muestra el comienzo y el final de la secuencia de cada uno de los 4 exones. Cuando estos exones corresponden a regiones codificantes los nucleótidos se agrupan en tripletes debajo de los cuales se detalla el aminoácido que codifican. Si el intrón interrumpe la finalización de un codon se designa mediante puntos. A ambos lados de la secuencia de cada exón se han descrito también las secuencias intrónicas flanqueantes, secuencias aceptora y donadora. También se indica el tamaño de cada exón y del intrón situado entre este exón y el siguiente.

eliminación de los intrones, denominadas sitios de procesamiento, se ajustan perfectamente a la secuencia C/AAG•A/G donde • es la posición donde se integra el intrón (Weber y Kabsch, 1994).

2.2 Actina 302.

2.2.1 Mapa físico.

El abordaje del estudio de la estructura genómica fue similar al de la Act 211 ya descrito. En el primer rastreo se analizaron 7.5×10^5 ufp, utilizando como sonda el clon de cDNA pArAct211. Los fagos positivos se hibridaron con el oligonucleótido 3, específico de la Act 302. En esta hibridación específica se obtuvo un clon positivo (λ gArAct22) que se caracterizó, elaborándose su mapa físico y localizando y secuenciando los exones que contenía, como se detalló en el análisis de la Act 211. Este clon genómico contiene los exones 3, 4, 5 y 6, como se muestra en la Figura 9. En la parte superior de dicha figura se representa el mapa físico del fago. Los exones codificantes se designan por cajas blancas y los no codificantes por cajas negras. En el centro de la figura se indican los tamaños de los exones e intrones en pb y kb respectivamente y en la parte inferior, el tamaño del gen en kb.

Dado que en el fago λ gArAct22 faltaban algunas secuencias codificantes, se realizó un segundo rastreo en la genoteca genómica descrita por Escalante y Sastre (1993). Se plaqueó el mismo número de fagos y se empleó como sonda el fragmento *Sa*I-*I*-*Sa*I de 4.5 kb del clon genómico λ gArAct22 que contenía los exones 3, 4 y 5 del gen. El clon positivo que se obtuvo, λ gArAct10A, contenía 2 de los exones ya descritos en el clon del primer rastreo (exones 3 y 4) y dos exones nuevos, el 1 y el 2, como se muestra en la Figura 9, en la que también se muestra el mapa físico de este fago.

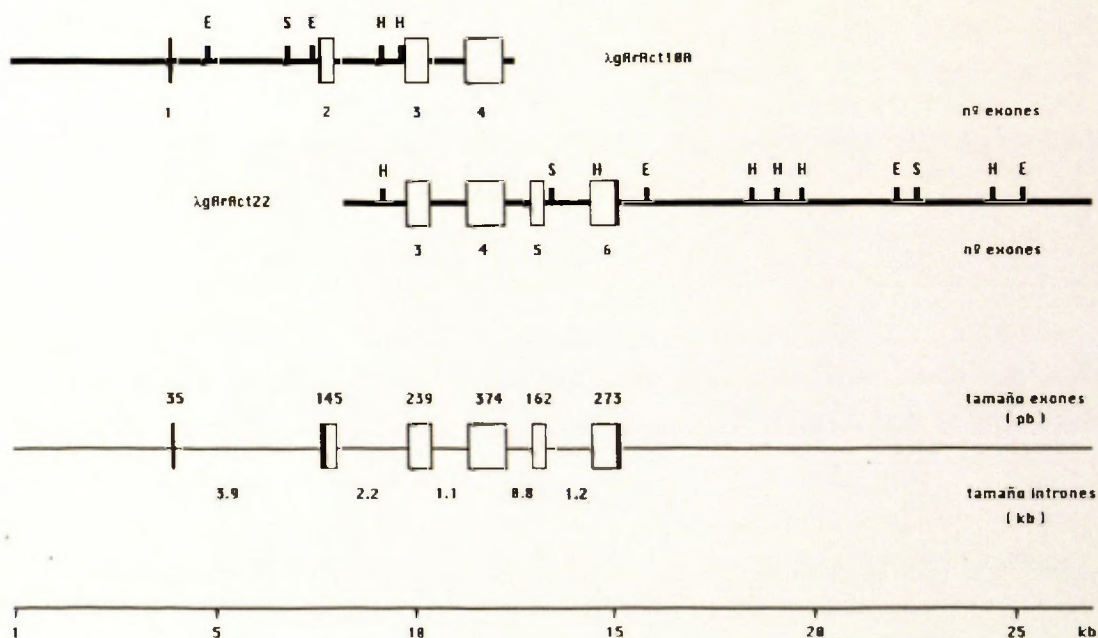


Figura 9: Estructura de los clones genómicos λ gArAct22 y λ gArAct10A correspondientes a la isoforma Act 302 de *Artemia*, con la posición de las dianas de restricción para tres diferentes enzimas, *Eco*RI (E), *Sa*I (S) y *Hind*III (H). La posición de los exones se indica mediante cajas blancas para las regiones codificantes y negras para las no codificantes. En la parte central se indica el tamaño de los exones e intrones correspondientes. En la parte inferior se representa el tamaño en kb de la región genómica analizada que cubre el gen completo.

La determinación del tamaño y posición de estos 2 nuevos exones, resultó más complicada, ya que el único cDNA de que se disponía estaba truncado en el extremo 5' del mRNA. Carecía de la zona no codificante, y, además, le faltaban 49 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína. Reiterados rastreos de genotecas de cDNA siguieron sin permitir aislar clones más largos. Los 19 nucleótidos que restaban en el cDNA para llegar a la posición 41- 42 (19 primeros nucleótidos del exón 3), que ya habíamos descrito en la Act 211, se identificaron al secuenciar este exón gracias a la homología con las otras isoformas. Al secuenciar el exón 3, por delante del aminoácido 42 aparecía una posible secuencia aceptora de procesamiento, lo que hacía suponer la existencia de un intrón en esa posición en la Act 302, como se confirmaría posteriormente. El primer exón codificante (exón 2) se secuenció, así mismo, gracias a la homología de la secuencia con la de otras actinas. Una hibridación con el oligonucleótido 15 (descrito en la Figura 12A), permitió su localización y secuenciación. Sin embargo, al avanzar hacia 5', se descubrió una nueva posible secuencia aceptora de procesamiento, lo que sugería la existencia de un primer exón no codificante, imposible de localizar por homología de secuencia.

Para poder obtener la secuencia de la región 5' no traducida del mRNA de la Act 302 se empleó la técnica denominada PCR anclado. Esta técnica ofrece la posibilidad de seleccionar, ampliar y aislar un mensajero de interés, cuando solamente se conoce una secuencia parcial del mismo. El protocolo que se siguió se describe en el punto 2.8.2 de los Materiales y Métodos. En la Figura 10 se muestra un esquema de los pasos seguidos hasta la obtención de la zona 5' de la Act 302. El primer paso consiste en la síntesis de una cadena de cDNA complementaria a la región 5' del mRNA. Para ello se usó como cebador un oligonucleótido complementario a la región codificante amino terminal de la proteína (oligonucleótido 13, complementario al clon Act 211, descrito en la Figura 6A). Este oligonucleótido se hibridó con RNA poli (A)⁺, incubándose posteriormente con la transcriptasa en reverso. La cadena de cDNA obtenida no sería específica para la Act 302, sino que se transcribirían también las demás isoformas. El tiempo de poli (A)⁺ mRNA elegido fue de 20 horas ya que, en este tiempo, la expresión es muy alta para este gen (Figura 2).

A la primera cadena de cDNA se le pegó una cola de poli G por incubación con la transferasa terminal y GTP. Sobre dicha cadena se realizó la primera amplificación por PCR usando como cebadores el oligonucleótido 13 y un oligonucleótido poli C complementario a la cola poli G añadida al cDNA. Un segundo PCR se efectuó a partir del producto del primero, usando como iniciadores el oligonucleótido poli C nuevamente y un nuevo oligonucleótido, el oligonucleótido 14, complementario a la región codificante del exón 2 de la Act 302. Se eliminaban así muchos de los fragmentos ampliados en el primer PCR, falsos positivos, aunque pudieran seguir arrastrándose algunos, por homología de secuencia. El producto de este

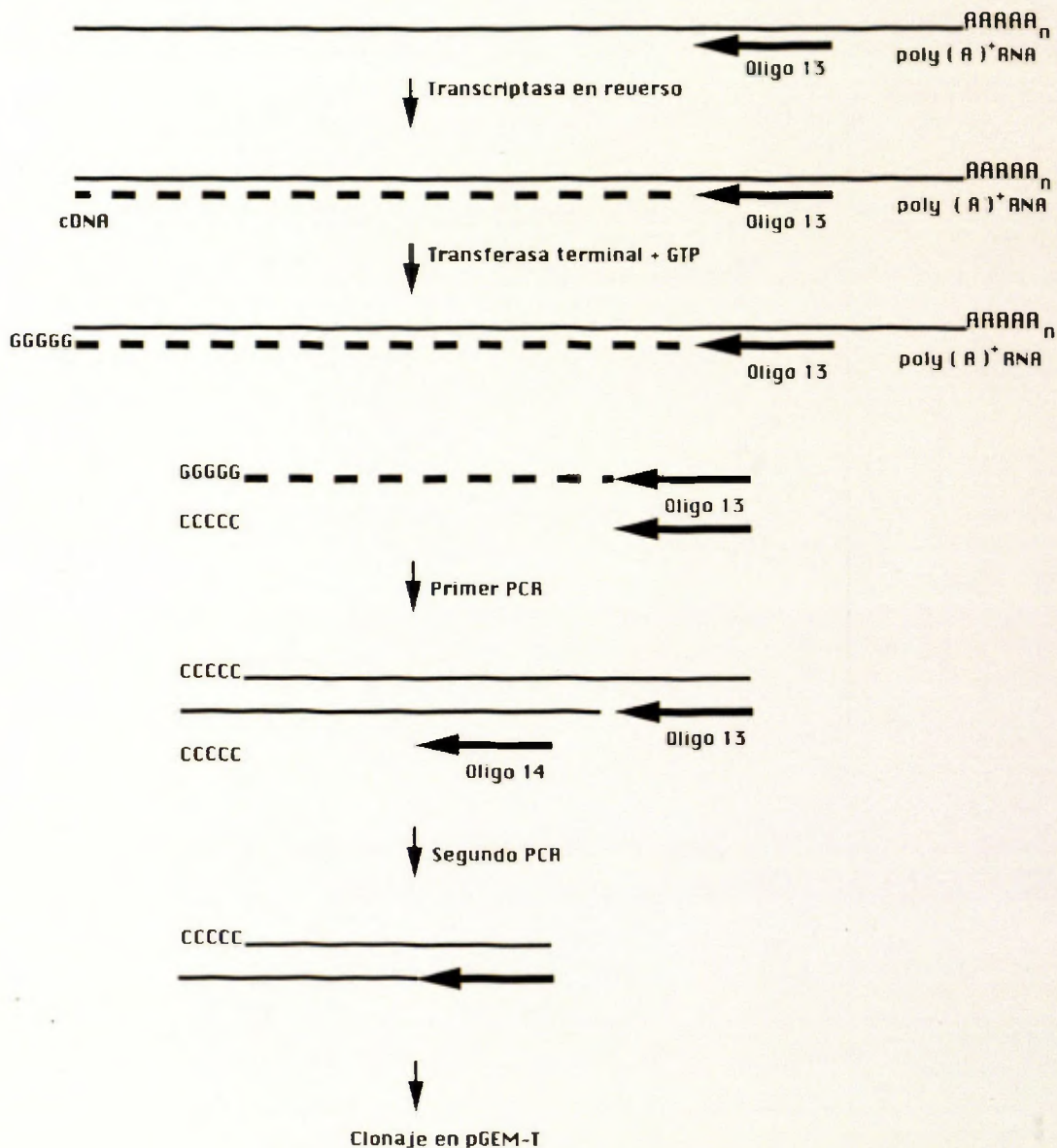


Figura 10: Esquema representativo de la reacción de PCR anclado. Un oligonucleótido complementario (oligonucleótido 13) a la secuencia del mRNA cuyo extremo 5' se pretende aislar se hibrida con RNA poli (A)⁺. Después de una incubación con transcriptasa en reverso, se obtiene el extremo 5' del cDNA completo (línea gruesa de trazo discontinuo). A esta primera cadena de cDNA se le pega una cola poli G mediante una incubación con transferasa terminal y GTP. Esta cadena se usa como molde para el primer PCR, utilizando como cebadores un oligonucleótido poli C y el oligonucleótido antes mencionado (oligonucleótido 13). Sobre el producto del primer PCR se realiza una nueva amplificación con el oligonucleótido poli C y un nuevo oligonucleótido específico situado más 5' en el gen, el oligonucleótido 14. El producto del segundo PCR se clona en el vector plasmídico pGEM-T.

segundo PCR se clonó en el vector plasmídico pGEM-T. Los transformantes se crecieron en filtros de nitrocelulosa y se hibridaron con el oligonucleótido 305, complementario a la región 5' no traducida del exón 2 y absolutamente específico para la Act 302 (Figuras 11 y 12A). De este modo se seleccionaron exclusivamente los clones que contenían la región 5' no traducida de la Act 302. Al final del proceso se obtuvo un clon positivo y al secuenciarlo se confirmó la existencia de un primer intrón en la región no codificante y de un primer exón de pequeño tamaño (35 pb).

La secuencia de nucleótidos que faltaban en el clon de cDNA pArAct302 descrito en Macías y Sastre (1990), se detalla en la Figura 11. Los 35 primeros nucleótidos corresponden al primer exón. El segundo exón tiene una parte no codificante (en negrita) y una parte codificante. Los últimos 19 nucleótidos corresponden al comienzo del tercer exón. A partir de ahí, la secuencia de la Act 302 ya estaba descrita en el cDNA incompleto (Macías y Sastre, 1990).

En definitiva, el gen de la isoforma Act 302 consta de 6 exones, 2 más que la Act 211, también de tamaños muy variados, separados por 5 intrones. Tiene también un exón muy pequeño en posición 5' no traducida (35 pb). La región 5' desde el comienzo del clon hasta el primer exón, cubre una distancia de 4 kb. De este fragmento genómico se secuenciaron 1063 nucleótidos para analizar sus secuencias reguladoras (apartado 3.2 de Resultados).

```

1  TACCAATTCG CTTTGCTTCT TGTGTTACTTCTTTG/ATTGA GGCTCGAATT TCAAAATGTG
                                Oligo 306                Oligo 305

61  TGACGACGAG GTAGCTGCAT TGGTTGTTGA CAATGGATCT GGAATGTGTA AGGCTGGTTT
                                Oligo 14

121  TGTCGGTGAC GATGCCCCC GTGCTGTTTT TCCTTCGATT GTTGGTCGTC CACGTCATCA
                                Oligo 13

181  G/GGTGTGATGGTTGGTATGG

```

Figura 11: Secuencia de los 200 nucleótidos de la isoforma Act 302 de *Artemia* no presentes en los clones de cDNA. Mediante letras en negrita se señalan los nucleótidos correspondientes a la secuencia no codificante. Las barras diagonales marcan la separación entre exones. Sobre la secuencia se señala la posición de los oligonucleótidos empleados en el PCR anclado (oligonucleótidos 13, 14 y 305) y la del oligonucleótido 306, utilizado en los análisis de hibridación con RNA.

En la Figura 12 se muestran los oligonucleótidos específicos utilizados para la secuenciación de este gen. En el panel A se muestra la secuencia de los oligonucleótidos, indicando la región a la que son homólogos con el cDNA pArAct302 (numerada a partir del nucleótido determinado como inicio de la transcripción), o con las secuencias genómicas (numeradas a partir del primer nucleótido de cada exón). El panel B muestra la posición de los oligonucleótidos sobre las cajas de sus respectivos exones o bien en el intrón 4 (oligonucleótido 303). Las flechas indican el sentido de su síntesis. Los oligonucleótidos 307, 308, 309 y 310 se sintetizaron a partir de la secuencia promotora, por lo que no se han situado sobre ningún exón.

El clon que se obtuvo en el segundo rastreo (λ gArAct10A), no contenía la secuencia 3' no codificante, región que permite identificar inequívocamente las distintas isoformas de actina. Además, los datos de secuencia de los exones 1 y 2 proceden exclusivamente de este fago genómico. La secuencia completa de la región 5' no traducida se obtuvo posteriormente mediante PCR anclado, basándonos en la secuencia genómica de los exones 2 y 3. Por estas razones pensamos que era conveniente demostrar que el fago λ gArAct10A codificaba la isoforma Act 302 y no otra isoforma. Se hibridó para ello RNA de 20 horas de desarrollo con 2 oligonucleótidos diferentes, uno situado en la región 5' del gen, oligonucleótido 306, (Figuras 11 y 12) y otro situado en la región 3', oligonucleótido 3. El resultado se muestra en la figura 13, en que ambos oligonucleótidos hibridan con el mismo mRNA de 1.6 kb, confirmando que ambos son complementarios al mRNA de la Act 302 (Figura 2). En ambos carriles se observan también hibridaciones con los RNAs ribosómicos de *Artemia* que diversos experimentos de control demostraron no ser específicas.

2.2.2 Variaciones de secuencia del DNA genómico respecto al cDNA.

A diferencia de lo que ocurría con la Act 211, el gen completo de la Act 302 se obtuvo a partir de 2 clones solapantes de librerías genómicas de distinto origen. Como se describe en el punto 2.2.1, el clon λ gArAct22 que contiene los exones 3, 4, 5 y 6 procede de una genoteca genómica heterogénea (Franco et al., 1994), por lo que se observaron, como en el caso de la Act 211, numerosos cambios entre la secuencia del cDNA y la del DNA genómico. Estos resultados se muestran en la Figura 14, que sigue el mismo esquema descrito para la Act 211 (punto 2.1.2 de Resultados).

El análisis de los datos del clon λ gArAct22 conduce a conclusiones similares a las obtenidas para la Act 211. Existe una proporción de cambio de nucleótidos del 4.1%, un número muy superior de transiciones que de transversiones y de cambios sinónimos frente a

A

Oligo	Situación	nt inicial	Secuencia (5'-3')	nt final
3	cDNA	1223	CGG GCA AGT CAT TTA GAA TG	1204
14	cDNA	96	CCA TTG TCA ACA ACC AAT GCA G	75
15	cDNA	56	ATG TGT GAC GAC GAG GTA GC	75
35	cDNA	425	ATG TTT GAA ACC TTC AAC A	443
301	cDNA	212	AGC TAT GTC GGT GAT GAG GC	231
302	cDNA	686	CGT GAC ATC AAG GAG AAG C	704
303	Intrón 4	-67	CAC CTG AAA GTT TTG ACT G	-49
304	cDNA	960	GTG GTA CTA CCA TGT TCC C	978
305	cDNA	55	TTT GAA ATC CGT GCC TCA AC	36
306	cDNA	35	CAG AGA AGT AAC ACA AGA AGC	15
307	Promotor	-119	CGG ATG TCT TAT CTC GAG CTG	-99
308	Promotor	-289	CCT TAC GTT CTG GTG TCA TGG	-309
309	Promotor	-579	GCA AAA ATC ATC CCA GCA AGA TCC	-602
310	Promotor	-409	GGT TGT GTG GTC CTC ATG CAG G	-388

B

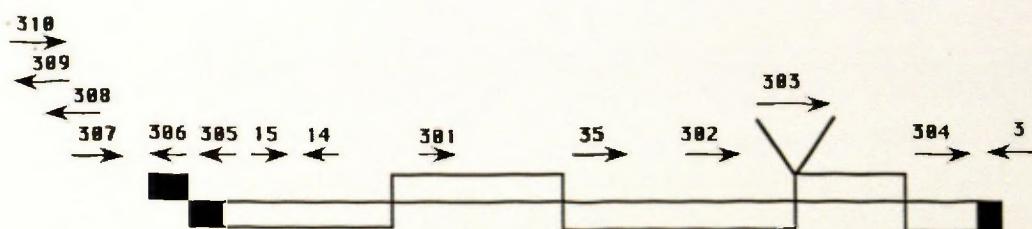


Figura 12: Oligonucleótidos diseñados para el aislamiento y caracterización de clones genómicos correspondientes a la isoforma Act 302 de *Artemia*. A) Oligonucleótidos empleados para el aislamiento, secuenciación y caracterización de la isoforma Act 302. Todos se han numerado en sentido 5'-3', indicando el nucleótido inicial y final, asignando como primera base el posible inicio de transcripción para los que están situados en el cDNA o en el promotor. Los oligonucleótidos situados en intrones se han numerado a partir de la primera base del extremo 5' del intrón (valores positivos) o la última del extremo 3' (valores negativos). B) Situación de dichos oligonucleótidos sobre una representación esquemática de los exones constituyentes de la isoforma de actina 302. Las cajas blancas corresponden a regiones codificantes y las negras a las no codificantes. El oligonucleótido 303 se sitúa en el cuarto intrón. Los oligonucleótidos 307, 308, 309 y 310 son complementarios a la secuencia del promotor.

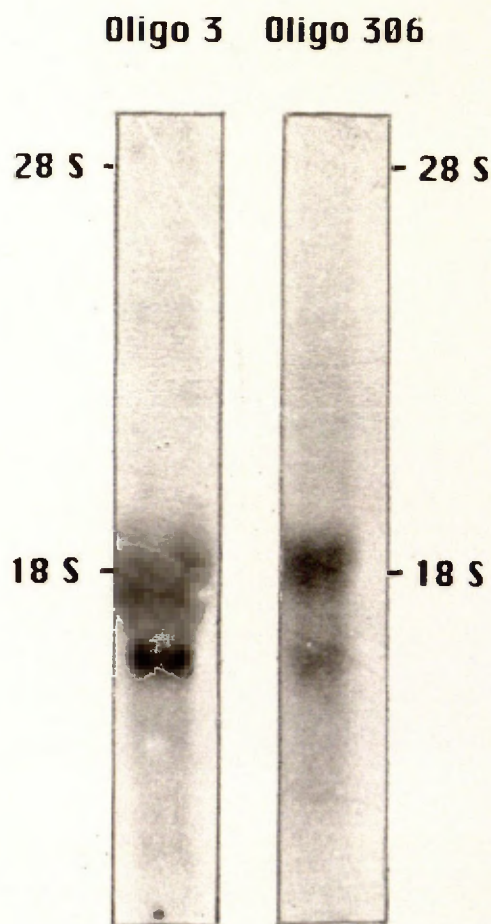


Figura 13: Hibridación de RNA con los oligonucleótidos 3 y 306 de la isoforma Act 302. 15 μ g de RNA total de nauplias de 20 horas de desarrollo se analizaron en geles de 2.2M - formaldehído, 1.5% agarosa, se transfirieron a filtros de nylon e hibridaron con los oligonucleótidos 306 y 3 complementarios a los extremos 5' y 3', no traducidos del mRNA, respectivamente (ver Figura 12). Se indica el lugar de migración de los RNAs ribosómicos 28 y 18S de rata. Ambos oligonucleótidos hibridan con el mismo mRNA de 1.6 Kb, situado inmediatamente por debajo del RNA ribosómico 18S.

		Exón 3		Exón 4	Exón 5	Exón 6
Zonas no codificantes (5'y3')	nt	Transiciones		—	—	2/47
		Transversiones		—	—	1/47
Zonas codificantes	nt	Transiciones		5/239	10/374	6/162
		Transversiones		1/239	6/374	3/162
	aa	Cambios sinónimos		5/79	15/124	5/54
		Cambios no sinónimos	Cambios conservativos	1/79	1/124	1/54
			Cambios no conservativos	0	0	3/54

Figura 14: Cambios en la secuencia del fago genómico λ gArAct22 respecto al cDNA en la isoforma Act 302 de *Artemia*. En la tabla se presenta el resultado del análisis comparativo entre las secuencias del DNA genómico correspondiente a los exones 3, 4, 5 y 6 del fago λ gArAct22 de la Act 302 y el cDNA correspondiente. En las regiones codificantes y no codificantes se analizan los dos posibles tipos de cambios de nucleótidos, transiciones y transversiones. En las regiones codificantes se estudian además los cambios correspondientes a los aminoácidos, cambios sinónimos y no sinónimos, y entre estos últimos los conservativos y no conservativos. En todos los casos se muestra en el numerador el número de cambios observados y en el denominador el número de nucleótidos o aminoácidos comparados.

		Exón 1		Exón 2	Exón 3	Exón 4
Zonas no codificantes (5'y3')	nt	Transiciones		0	0	—
		Transversiones		0	0	—
Zonas codificantes	nt	Transiciones		—	1/125	0
		Transversiones		—	0	0
	aa	Cambios sinónimos		—	1/41	0
		Cambios no sinónimos	Cambios conservativos	—	0	0
			Cambios no conservativos	—	0	0

Figura 15: Cambios en la secuencia del fago genómico λ gArAct10A respecto al cDNA en la isoforma Act 302 de *Artemia*. En la tabla se presenta el resultado del análisis entre las secuencias del DNA genómico correspondiente a los exones 1, 2, 3 y 4 del fago λ gArAct10A de la Act 302 y el cDNA correspondiente. En las regiones codificantes y no codificantes se analizan los dos tipos posibles de cambios de nucleótidos, transiciones y transversiones. En las regiones codificantes se estudian además los cambios correspondientes a los aminoácidos, cambios sinónimos y no sinónimos, y entre estos últimos los conservativos y no conservativos. En el numerador de cada fracción se muestran los cambios encontrados y en el denominador los nucleótidos o aminoácidos comparados.

cambios no sinónimos. Estos cambios únicamente se reflejan en el cambio de 6 aminoácidos, siendo tres de los cambios de carácter conservativo y los otros tres no conservativos.

El clon λ gArAct10A que contiene los exones 1, 2, 3 y 4 procede, sin embargo, de una genoteca homogénea de *Artemia franciscana* (Escalante y Sastre, 1993). El número de cambios observados experimenta una drástica caída frente a lo descrito hasta ahora (0.12%), (Figura 15). Se encontró solamente una transición en el exón 2 (región codificante), que implicaba un cambio sinónimo en la secuencia de la proteína. En el resto la identidad era total. Es posible establecer aquí por tanto, un buen análisis comparativo entre las 2 genotecas, gracias a los exones 3 y 4 secuenciados en ambas: secuenciados en la genoteca homogénea no presentan ni un solo cambio (Figura 15), mientras que secuenciados en la librería heterogénea (Figura 14) presentan una variación del 2.5% y el 4.3% de los nucleótidos de cada exón respectivamente.

2.2.3 Secuencias flanqueantes intrón-exón.

En la Figura 16 se describe el conjunto de secuencias que limitan las uniones intrón-exón del gen de la Act 302. Las secuencias correspondientes a los exones 3 y 4, presentes en los fagos λ gArAct 22 y λ gArAct 10A, eran idénticas en ambos fagos. El gen de la Act 302 está constituido por 6 exones y 5 intrones, cuyos tamaños se detallan en el gráfico. Al igual que en la Act 211, estas secuencias se ajustan perfectamente a las secuencias consenso descritas, tanto en los nucleótidos que forman parte del intrón como del exón.

En comparación con la Act 211, se conserva la posición del segundo intrón entre los aminoácidos 41 y 42. No existe, sin embargo, un intrón en el codon 168 y aparecen tres nuevos puntos de corte de la secuencia codificante en los codones 121-122, 246-247 y 301. Este último interrumpe la fase de lectura en el primer nucleótido del triplete.

2.3 Actina 403.

2.3.1 Mapa físico.

En el caso de esta isoforma, ninguno de los clones genómicos que hibridaban con la sonda del cDNA completo de la Act 211 lo hizo con la sonda específica de la Act 403 (oligonucleótido 4). Para llevar a cabo el aislamiento de clones genómicos para la Act 403, se plaquearon 7.5×10^5 fagos de la genoteca genómica de *Artemia franciscana* (Escalante y Sastre, 1993). Con objeto de seleccionar clones que contuvieran la totalidad del gen se utilizaron dos sondas:

nº Exón	S. aceptora	Secuencia codificante	S. donadora	T. exon	T. intrón
1		TACCAATTC-----ACTTCTTTG	gtaagtgtg	35 pb	3.9 kb
2	tcttcttag	GITGAGGCT-----CGT CAT CAG R H Q 41	gtataaccg	145 pb	2.2 kb
3	tcactttag	GGT GTG AGT-----ATG ACA CAG G U M M T Q 42 121	gtatgtaac	239 pb	1.1 kb
4	glattgcag	ATT ATG TTT-----GAT GGA CAG I M F D G Q 122 246	gtaaggcag	374 pb	0.8 kb
5	tgglagtag	ATT ATT ACC-----CTT TCA G . . I I T L S G 247 301	gtaatatcc	162 pb	1.2 kb
6	ttgttttag	. GT GGT ACT-----3' poly A G G T 301		273 pb	

Figura 16: **Secuencias de las regiones de unión intrón-exón en la isoforma Act 302 de *Artemia***. En la parte central se muestra la secuencia del comienzo y el final de cada uno de los 6 exones. Cuando estos exones corresponden a regiones codificantes, los nucleótidos se agrupan en tripletes debajo de los cuales se detalla el aminoácido que codifican. Si el intrón interrumpe la finalización de un codon se designa mediante puntos. A ambos lados de la secuencia de cada exón se han descrito también las secuencias intrónicas flanqueantes, secuencias aceptora y donadora. En las dos últimas columnas se indica el tamaño de cada exón y del intrón situado entre dos exones.

- Un fragmento *Eco* RI- *Bgl* II que contiene las primeras 310 pb del clon de cDNA pArAct211.
- Un fragmento *Kpn* I- *Bam* HI que contiene las últimas 386 pb del cDNA pArAct403. Esta sonda es específica para la isoforma Act 403.

Se obtuvo un clon que hibridaba con ambas sondas, el clon λ gArAct5A, cuya representación se muestra en la Figura 17. Este clon contiene 7 exones, estando incompleto el séptimo, por lo que su caja no está cerrada. El clon carecía de los últimos 275 nucleótidos del cDNA pArAct403, 117 de los cuales formaban parte de la secuencia codificante. Para completar el gen fue necesario un segundo rastreo de la misma librería genómica. Se utilizó como sonda el fragmento *Kpn* I- *Bam* HI del clon de cDNA pArAct403. Entre los clones positivos obtenidos

se seleccionó uno que también hibridaba con el oligonucleótido específico 4 (Figura 18A), complementario al cDNA de la pArAct403 de los nucleótidos 1254 al 1274. Se consiguió de este modo aislar un clon solapante con el primero, que concluía la secuencia final del exón 7 (λ gArAct11A).

La Figura 17 describe el mapa físico de los dos clones genómicos correspondientes a la Act 403. Se señalan las dianas de restricción correspondientes, los exones (en forma de cajas blancas para las secuencias codificantes y negras para las no codificantes), el tamaño de exones e intrones y el tamaño que cubre el gen completo. Como las otras dos isoformas, presenta un exón de pequeño tamaño (31 pb) en la región 5' no codificante. La distancia en este caso entre el comienzo del clon y el primer exón es de 2.200 pb, de los que 1300 se secuenciaron para efectuar un análisis estructural de las posibles regiones reguladoras (apartado 3.2 de Resultados).

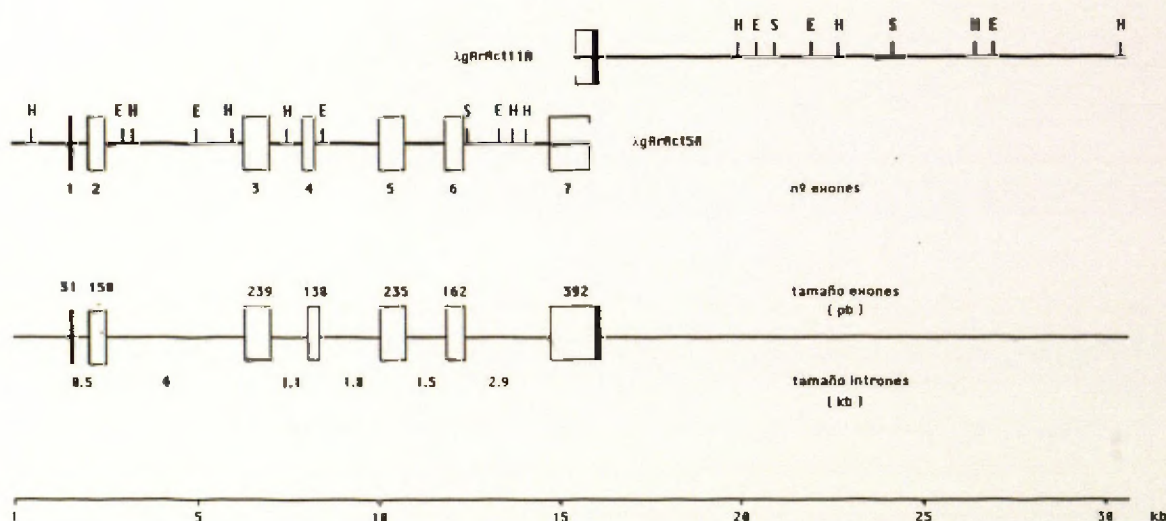


Figura 17: Estructura de los clones genómicos λ gArAct5A y λ gArAct11A correspondientes a la isoforma Act 403. En la parte superior de la figura se describe el mapa físico de los clones genómicos solapantes λ gArAct5A y λ gArAct11A que contienen el gen completo de la isoforma Act 403 de *Artemia*, con la posición de las dianas de restricción para tres diferentes enzimas, *Eco* RI (E), *Sal* I (S) y *Hind* III (H). Sobre este mapa se indica la situación de los exones, con cajas blancas para las regiones codificantes y negras para las no codificantes. En la parte central se indica el tamaño de los exones e intrones. En la parte inferior el tamaño en kb de la región genómica analizada que cubre el gen completo.

En la Figura 18 se presentan los oligonucleótidos específicos que se diseñaron para la secuenciación de esta isoforma. En el panel superior se muestra la secuencia de los oligonucleótidos así como la región a la que son complementarios. Estas secuencias están numeradas a partir de la primera base de cada intrón o desde el inicio de transcripción situado en posición más 5', según se indica en cada caso. En el panel inferior se muestra la situación de cada oligonucleótido sobre las regiones a las que son complementarios. También se indican los oligonucleótidos que se sintetizaron a partir de la secuencia de los intrones 2 y 3: 402 y 403 respectivamente y los que se utilizaron para analizar las secuencias reguladoras (406, 407 y 408). El sentido de síntesis, en todos los casos, está determinado por la flecha.

El cDNA descrito previamente de la Act 403 era incompleto, como también sucedía con el de la Act 302. Se encontraba truncado en la región 5' no traducida, aunque presentaba toda la secuencia codificante. La secuenciación con el oligonucleótido 402 (Figura 18), permitió leer toda la región codificante y la no codificante del exón 2, llegando hasta una posible secuencia aceptora de procesamiento. Para poder confirmar este sitio de procesamiento, en caso de existir, y localizar el posible primer exón del gen, intentamos clonar la región 5' no traducida del mRNA mediante PCR anclado. El protocolo empleado fue el mismo usado para la Act 302, descrito en el punto 2.2.1 de Resultados. Se diseñó un oligonucleótido de la región no codificante del exón 2 caracterizado en el clon genómico λ gArAct5A, oligonucleótido 404 (Figura 18), que se utilizó para la selección de clones positivos. Se aislaron 4 clones positivos cuya secuencia confirmó la existencia de un intrón en la región 5' no traducida del mRNA de la Act 403 y permitió sintetizar el oligonucleótido 405 que fue utilizado para identificar y secuenciar el primer exón del gen.

2.3.2 Variaciones de secuencia del DNA genómico respecto al cDNA.

Al proceder los 2 clones solapantes que contienen la isoforma Act 403 de la genoteca genómica formada por una población homogénea, cabía esperar la existencia de muy pocos cambios entre la secuencia del DNA genómico y el cDNA. Los datos obtenidos en la comparación de la secuencia de los clones genómicos y de cDNA se muestran en la Figura 19, cuya organización es idéntica a la descrita para las otras isoformas. Existen muy pocos cambios (0.51% de los nucleótidos) y cuando aparecen son casi todos cambios sinónimos (6 aminoácidos en toda la secuencia). Solamente se encontró un cambio no conservativo en el exón 2.

A

Oligo	Situación	nt inicial	Secuencia (5'-3')	nt final
4	cDNA	1274	GGC CGT TAA TCA TCT TTC AAC	1254
401	cDNA	67	GTG TGA CGA CGA AGT TGC CG	86
402	Intrón 2	84	CAG AGA ATG TCA CTA GAC CG	65
403	Intrón 3	44	GTG AGA AAC CAT AAT GAT TC	25
404	cDNA	52	TTG GTA AAG ACT TGA GTA AAC	32
405	cDNA	27	CAG GAG AAG AGC TAG CAA ACG	7
406	Promotor	-158	CAG AAT GAT GGT GCG TCA GC	-139
407	Promotor	-318	GAT CAA TAA TAC CGT GTT TTG C	-339
408	Promotor	-754	GTT ACC TAA TTA TGG GAA CTG	-774

B

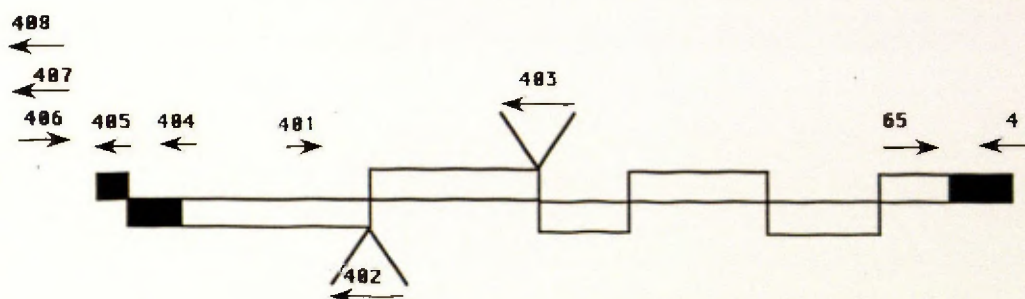


Figura 18: Oligonucleótidos diseñados para el aislamiento y caracterización de clones genómicos correspondientes a la isoforma Act 403 de *Artemia*. A) Oligonucleótidos empleados para el aislamiento, secuenciación y caracterización de la isoforma Act 403. Todos se han numerado en sentido 5'-3', indicando el nucleótido inicial y final, asignando como primera base el posible inicio de transcripción para los que están situados en el cDNA o en el promotor. Los oligonucleótidos situados en intrones se han numerado a partir de la primera base del extremo 5' del intrón (valores positivos) o de la última del extremo 3' (valores negativos). B) Situación de dichos oligonucleótidos sobre una representación esquemática de los exones constituyentes de la isoforma de actina 403. Las cajas blancas corresponden a las regiones codificantes y las negras a las no codificantes. Los oligonucleótidos 402 y 403 se sitúan en el segundo y tercer intrón respectivamente. Los oligonucleótidos 406, 407 y 408 son complementarios a la secuencia del promotor. El oligonucleótido 65 se describe en la Figura 6.

			E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Zonas no codificantes (5'y3')	nt	Transiciones	0	0	—	—	—	—	0
		Transversiones	0	0	—	—	—	—	0
Zonas codificantes	nt	Transiciones	—	2/125	0	0	1/235	1/162	1/226
		Transversiones	—	0	1/239	0	0	0	1/226
	aa	Cambios sinónimos	—	1/41	1/79	0	1/78	1/54	2/75
		Cambios no sinónimos	—	0	0	0	0	0	0
		Cambios no conservativos	—	1/41	0	0	0	0	0

Figura 19: Cambios en la secuencia de los fagos genómicos λ gArAct5A y λ gArAct11A respecto al cDNA en la isoforma Act 403 de *Artemia*. En la tabla se presenta el resultado del análisis comparativo entre las secuencias de los fagos genómicos λ gArAct5A y λ gArAct11A de la Act 403, y el cDNA correspondiente. En las regiones codificantes y no codificantes se analizan los dos tipos de cambios de nucleótidos, transiciones y transversiones. En las regiones codificantes se estudian además los cambios correspondientes a los aminoácidos, cambios sinónimos y no sinónimos, y entre estos últimos los conservativos y no conservativos. En el numerador de cada fracción se indica el número de cambios encontrados y en el denominador el de nucleótidos o aminoácidos comparados.

2.3.3 Secuencias flanqueantes intrón-exón.

En la Figura 20 se detallan las secuencias de las zonas de unión exón-intrón para la Act 403. Como en las otras dos isoformas estudiadas, estas secuencias se ajustan a las canónicas descritas. El cuadro también refleja los tamaños de los intrones y de los exones. Este gen presenta 6 intrones, uno más que la Act 302. El intrón 4 (en el codon 168) y el intrón 6 (codon 301), interrumpen la secuencia codificante en el primer nucleótido del triplete y el resto lo hacen en fase tres (posiciones de codones 41-42, 121-122 y 246-247).

nº Exón	S. aceptora	Secuencia codificante	S. donadora	T. exón	T. intrón
1		GTTAGTCGT-----TCTGTAAG	gtatggggg	31 pb	0.5 kb
2	atttttcag	GTTTACTCA-----AGA CAC CAG R H Q 41	gtaagtttt	158 pb	4 kb
3	tttccttag	GGT GTC ATG-----ATG ACT CAG G U M M T Q 42 121	gtaaagtct	239 pb	1.1 kb
4	atattacag	ATC ATG TTC-----TAC GAA G . I M F Y E G 122 168	gtaaacaata	138 pb	1.8 kb
5	ccattatag	. GC TAC GCT-----GAT GGT CAG G Y A D G Q 168 246	gtaaagatc	235 pb	1.5 kb
6	tgtttgcag	GTA ATC ACT-----TTG TCT G . U I T L S G 247 301	gtgagtttt	162 pb	2.9 kb
7	ttcatgcag	. GT GGT ACC-----3'poly A G G T 301		392 pb	

Figura 20: Secuencias de las regiones de unión intrón-exón en la isoforma Act 403 de *Artemia*. En la parte central se muestra el comienzo y el final de la secuencia de cada uno de los 7 exones. Cuando estos exones corresponden a regiones codificantes los nucleótidos se agrupan en tripletes debajo de los cuales se detalla el aminoácido que codifican. Si el intrón interrumpe la finalización de un codon se designa mediante puntos. A ambos lados de la secuencia de cada exón se han descrito también las secuencias intrónicas flanqueantes, secuencias aceptora y donadora. En las dos últimas columnas se indica el tamaño de cada exón así como el del intrón situado a continuación en el gen.

3. ANALISIS DE LAS SECUENCIAS 5' DE LAS TRES ISOFORMAS DE ACTINA EN *Artemia*.

3.1 Identificación de los posibles sitios de inicio de la transcripción.

Para llevar a cabo un estudio de las regiones reguladoras, es preciso determinar previamente los sitios de inicio de la transcripción. Los experimentos de PCR anclado aportaron los primeros datos en este estudio, pero este tipo de ensayos requieren una confirmación mediante otras técnicas.

En la identificación de los sitios de inicio de la transcripción, se emplearon además de la técnica de PCR anclado (Hirzmann et al., 1993) dos técnicas adicionales: la extensión del cebador y la protección a Nucleasa S1. Para ambas se utilizó RNA total de nauplias de *Artemia* de 20 horas de desarrollo, porque las tres isoformas poseen niveles altos de expresión en este estadio de desarrollo (Figuras 1, 2 y 3).

3.1.1 Ensayo de extensión del cebador.

El protocolo que se siguió para llevar a cabo este ensayo es básicamente el que se describe en Triezenberg (1993), y que se detalla en el apartado 2.9.1 de Materiales y Métodos. Los oligonucleótidos cebadores fueron los siguientes:

- oligonucleótido 205, complementario al cDNA de la Act 211 del nt 37 al 56 (Fig. 6A).
- oligonucleótido 305, complementario al cDNA de la Act 302 del nt 36 al 55 (Fig. 12A).
- oligonucleótido 404, complementario al cDNA de la Act 403 del nt 32 al 52 (Fig. 18A).

El resultado de este ensayo se muestra en la Figura 21, en la que se puede ver la extensión del cebador para cada una de las isoformas (Act 211, Act 302 y Act 403), así como la secuencia conocida de un DNA empleado como marcador para poder calcular el tamaño de los productos de extensión. La aparición de más de una banda en el caso de la Act 211 y la Act 403, puede deberse a la existencia de varios sitios de inicio de la transcripción. En este análisis los resultados fueron los siguientes:

Act 211: La señal más fuerte obtenida corresponde a la extensión del cebador hasta los nucleótidos -75 y -76, en dirección 5' respecto a la metionina iniciadora. Se observa otra señal más tenue de extensión hasta -81 pb del ATG iniciador. Atendiendo a este resultado, el cDNA descrito en Macías y Sastre (1990) sería incompleto en su región 5', faltándole al menos 20 nucleótidos del primer exón no codificante. Estos resultados no pudieron cotejarse con los

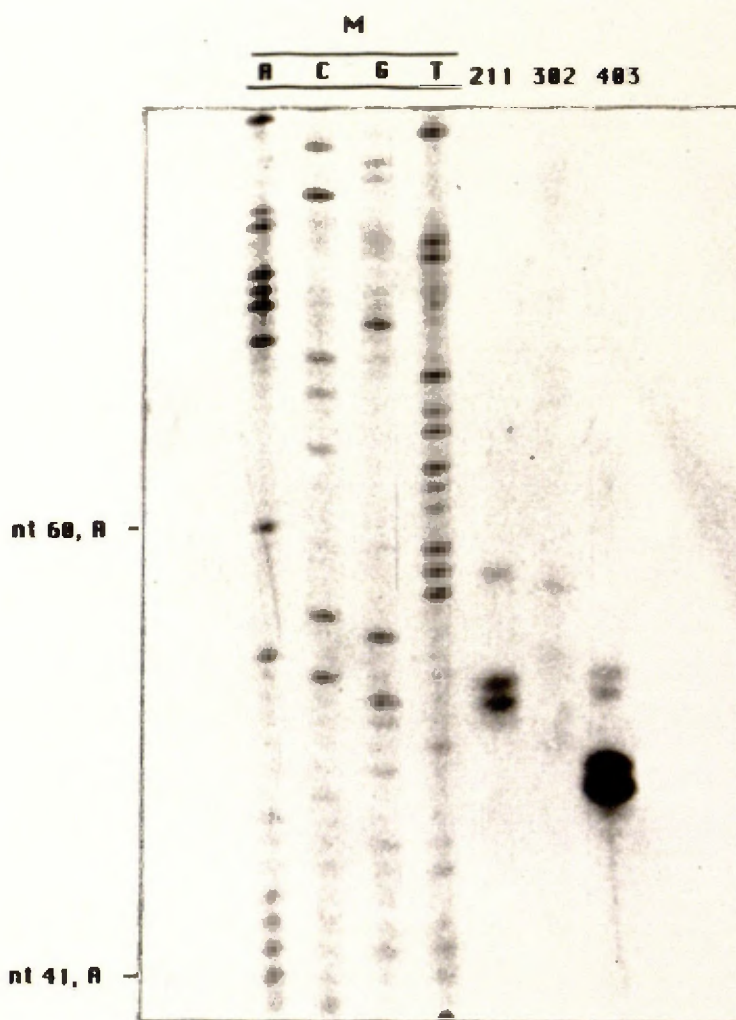


Figura 21: Identificación de los posibles sitios de inicio de la transcripción por extensión del cebador. Resultado del ensayo de extensión del cebador para las isoformas de actina de *Artemia* Act 211, Act 302 y Act 403, junto con la secuencia conocida de un DNA que se utiliza como marcador (M). En el marcador se señala la posición de las adeninas 41 y 60. Las Act 211 y 403 presentan dos señales de parada de la transcriptasa en reverso: la Act 211 en posiciones (-75)- (-76) y -81 respecto a la metionina iniciadora y la Act 403 en posiciones (-60)- (-61) y (-64)- (-65). La Act 302 presenta una única señal que corresponde a la posición -55 respecto al ATG iniciador.

del PCR anclado, ya que en esta isoforma no se realizó este ensayo. Se confirmarían posteriormente, mediante el ensayo de protección a Nucleasa S1.

Act 302: La única señal obtenida corresponde a la extensión hasta -55 pb de la metionina que inicia la región codificante. Los resultados en este caso concuerdan con los datos del PCR anclado donde se obtuvo un único clon positivo, cuyo extremo 5' se correspondía con el nucleótido - 55.

Act 403: Existen, como en la Act 211, dos posibles sitios de inicios de la transcripción. La señal más fuerte corresponde a la extensión hasta -60 y -61 pb del ATG y la señal más débil hasta los nucleótidos -64 y -65. En este caso, el PCR anclado también apoya estos resultados, ya que, de 4 clones positivos seleccionados, uno comenzaba en el nt -64 y los otros 3 en el nt -61. En este caso la proporción de clones de PCR anclado que comienzan en los nucleótidos -61 ó -64 (3:1) concuerda con la intensidad relativa de las correspondientes bandas obtenidas por extensión del cebador.

3.1.2 Ensayo de protección a Nucleasa S1.

Este ensayo se llevó a cabo para las tres isoformas de actina, aunque únicamente se obtuvieron resultados positivos para la Act 211. La sonda empleada para la Act 211 se generó por PCR y contenía el exón 1 del gen así como el fragmento de DNA del fago λ gArAct26 que precede al exón 1 (Figura 5) y cuya secuencia se muestra en la Figura 23. Para generar esta sonda, marcada únicamente en el extremo 5' de la cadena complementaria al mRNA, se realizó una amplificación por PCR usando como iniciadores el oligonucleótido 205 marcado con ^{32}P en el extremo 5' y el iniciador directo de secuenciación del pUC18. Como sustrato se utilizó el fragmento *Sa*/I-*Eco* RI del fago λ gArAct26, que contiene el exón 1, clonado en pUC18. Las condiciones de hibridación y de tratamiento con la Nucleasa S1 se describen en el apartado 2.9.2 de Materiales y Métodos.

En la Figura 22 se presenta el producto de la digestión con Nucleasa S1 analizado en un gel de poliacrilamida al 8%-7M urea. En los carriles 1 y 2 se corrió el fragmento hibridado con RNA de *Artemia* y digerido con 100 U de S1 (carril 1) y 300 U de S1 (carril 2). Los carriles 3 y 4 son los controles. En el carril 3 se corrió el fragmento genómico hibridado con RNA de *Artemia* pero sin tratamiento con Nucleasa S1 y en el carril 4 el mismo fragmento hibridado con un mRNA inespecífico de levadura y digerido con 300 U de Nucleasa S1. Para identificar el tamaño de los fragmentos protegidos se empleó como marcador el fragmento genómico degradado en residuos de purina, según se describe en Maxam y Gilbert (1980). Los resultados obtenidos confirman los datos del ensayo de extensión del cebador. Aparecen 2 regiones protegidas frente a la digestión cuyos extremos corresponden a los nucleótidos -75 y - 76 desde la metionina iniciadora en un caso y -81 y -82 en el otro.

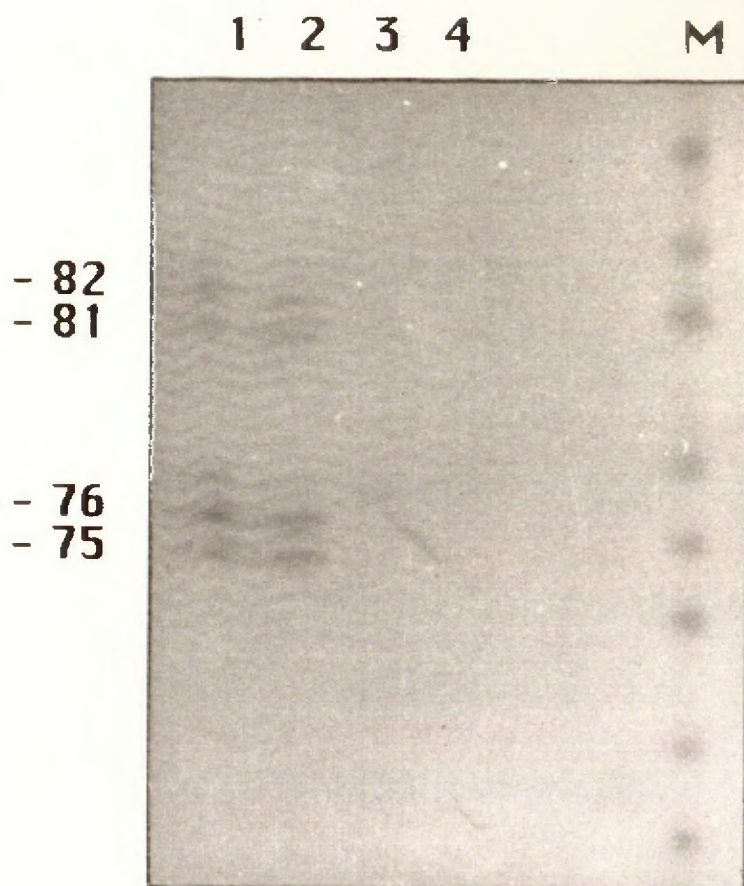


Figura 22: **Ensayo de protección a Nucleasa S1.** Un fragmento genómico correspondiente a la Act 211 se hibridó con 75 µg de RNA de *Artemias* cultivadas durante 20 horas. Se digirió con 100 U de Nucleasa S1 (carril 1) o 300 U de S1 (carril 2) y se analizó en un gel del 8% poliacrilamida - 7M urea. En el carril 3 se corrió dicho fragmento genómico hibridado con RNA de *Artemia* pero sin digerir y en el carril 4 se corrió el fragmento genómico hibridado con RNA de levadura y digerido con 300 U de S1. Como se observa, aparecen dos regiones protegidas cuyos extremos corresponden a las posiciones de nucleótidos (-75)- (-76) y (-81)- (-82) respecto al ATG iniciador. El marcador, empleado para identificar el tamaño de los fragmentos protegidos (muestra M), fue el propio fragmento genómico degradado en residuos de purina (Maxam y Gilbert, 1980).

En el caso de las isoformas Act 302 y Act 403 no se obtuvieron productos protegidos de la digestión por la Nucleasa S1. El problema en ambos casos pudo ser el pequeño tamaño del primer exón no codificante, 35 y 31 pb respectivamente. Se considera que el tamaño mínimo para que hibriden un DNA y un RNA debe ser de 40 pb, ya que por debajo del mismo, la inestabilidad hace peligrar la unión y favorece la digestión total de la sonda (Sambrook et al., 1989). Este problema se agravaba por el alto contenido en A y T de ambos exones, 63% y 58% respectivamente, que dificultaba aún más su hibridación con el mRNA. Para tratar de paliar este problema se intentaron varias condiciones de hibridación, pero siguió sin obtenerse protección alguna.

3.2 Análisis de las posibles regiones reguladoras de la transcripción.

Una vez determinado el origen de transcripción, el siguiente objetivo ha sido comenzar el estudio de las regiones de DNA que regulan la transcripción de estos genes. Habitualmente se distinguen dos tipos de regiones reguladoras de la transcripción: las regiones promotoras, que están situadas en la región que precede inmediatamente al origen de transcripción, y las regiones estimuladoras o represoras de la transcripción, situadas en posiciones y a distancias variables con respecto al origen de transcripción. La identificación y caracterización de las regiones reguladoras requiere ensayos funcionales que permitan medir su efecto sobre la transcripción de algún gen testigo. Dado que estos ensayos funcionales no están puestos a punto en *Artemia*, en esta Tesis hemos comenzado el estudio comparando la secuencia de nucleótidos de las regiones que anteceden los orígenes de transcripción con las de las zonas reguladoras descritas para otros genes para así poder identificar posibles regiones reguladoras en la región promotora de los genes de actina en *Artemia*.

El primer paso en este estudio ha sido determinar la secuencia de nucleótidos de las regiones que preceden al origen de transcripción en los genes de las tres isoformas de actina. Estas secuencias se muestran en las Figuras 23, 24 y 25. De la Act 211 se ha determinado la secuencia completa de 610 pb del fragmento contenido en el fago λ gArAct26 precediendo al exón 1 (Figura 23), de la Act 302 se han secuenciado 1063 pb que preceden al origen de transcripción (Figura 24) y de la Act 403, 1300 pb (Figura 25). En estas tres figuras se muestra también la secuencia completa de las regiones 5' no traducidas de los correspondientes mRNAs. Las secuencias se han numerado a partir de la adenina del codon de iniciación (ATG). Los nucleótidos que se han determinado como origen de transcripción se han escrito en negrita y se indican mediante un asterisco. También se señala mediante una línea diagonal la posición de los intrones que interrumpen la región 5' no traducida. Por último, se subraya la secuencia complementaria a la de los oligonucleótidos usados para la extensión del cebador (oligonucleótidos 205, 305 y 404, respectivamente).


```

-693 CTGTGCAAAA TTGTGAGCCA TTTATTTATG TATTGTTGGT GATTTTATGG AGGGGGGATA
-633 ACCACTATCT TGACCCCTAT TATTTTCTTA AAGGTACTTA TGAACATATT CCAATGATTC
                                     CCAAT
-573 CTGAAAAGTA ATTCCCTTCAT AATTAAATAT TGACATGCTA ATTATTATAA AAAACTCAGG
                                     Actin 5C-US
-513 GGACATGTTGG AGGTCTCCCA TCAGACGGGG TGCCCCATCC CAAATCCAA AAACTTTCTC
      b-HLH                                     AP-2
-453 TATTTTTTCC ATATTCCCAT ATATCTTGGC CTGCTCCTTT ACCTTGTTTC GAGCCCCCTC
                                     AP-2
-393 CCGAAACCAA AGGGAAGTAA TGTGTGTATC CCTCCCTCAT CTAGAGCAGT ATTTGCTACG
-333 GTCTCTAATT CCAAGTAAAA GTTATACCAT CATTACTTTT AAAACATATT AGCTTCTACC
-273 AAAAATCATC TGCCAAATTT AAAAATGTGT TTATTCCTCAG CCACCTACAA TCGTTTATTT
      b-HLH
-213 ATGCAAGGCT AGTGAGAAGG CCATATTTGC CTCTCTCTTA GAAACAAACT CCGTTGCTCT
-153 CCGCTGTACA TATTTTGGGA TTCGAGGACA CACGATTCTC TTAAATTTTA TGATATTTCT

      -81 -76 -75
      *   **
-93  CAAGGAAGTT TAAGATTAGT CCAAAAGTCG GCACAGTGCA AACCAGGAGT CCATAGTTTA
                                     Oligo 205
-33  CTTCAAG/GGTCAAATATTTA AAAAGGATTA ATCATG
      Intrón                                     -1

```

Figura 23: Secuencia de nucleótidos de la región 5' del gen de la isoforma Act 211. Se muestra la secuencia de nucleótidos de la región 5' no traducida y la secuencia promotora de la Act 211. Se ha asignado como nucleótido 1 la adenina del codon de iniciación ATG. El límite entre el primer y el segundo exón se indica mediante una línea diagonal. El oligonucleótido 205, empleado para el ensayo de extensión del cebador, se encuentra subrayado. Los posibles sitios de inicio de la transcripción, situados en las posiciones (-75)- (-76) y (-81), se han escrito en negrita y se denotan mediante asteriscos. Las posibles secuencias reguladoras se han subrayado, indicándose debajo el nombre de dicha secuencia consenso o el del factor de transcripción que se une a cada región.

```

-1118  AACTTAACCT TGACAGACAG GCCGAGAAAA GGAGGACGTC TAAACGACAA ACCAACGTGA
-1058  TTTGGGGGTG GCGCTCTGTG AATAAGTTTG GAGGACTCCG AAATTCCTCT GTGCGTGATG
      AP-1
-998   CATTAATCGT ACTCACCCCC CACCACTAAC AATAATAGTC TGTTTTGAGG ATGGAACAT
-938   CGAGTTCCGA AAAAACGTGC AAATTGCCTT CGTGTGCCCT TACTCTATAC CTATCTACCT
-878   TAGTTCTGCC CTAGGATGGG TGATAGACTA ACTATCAACA AGTGAAATGA AACATTTTAA
      b-HLH
-818   TGCAATTGTG AAGAGAGTTA TAACAGCATT GCATCTCACA TTGTCTGGC TTCACTCTAA
      b-HLH
-758   CTGTCTTGAC TATTGTCTAT TTATTGACTT TTAATTGACT ATTTGTCTTG CTTTACTCTA
-698   ATTCATCATG CCTCTCAAGT TTTCATCGT TGCATTGCAT TGTAAACATT GCTCTCATTG
-638   TAAATTATTT TTTCTATTTT GACTATTTTA TATGTGGAT CTGCTGGGA TGATTTTGC
-578   TGGGTCGAAT TTCCCAATCG CTATGTTTGG CTGGTGGTTG GGTTTGCTGG GTGGAAGCTC
      CCAAT
-518   GTTTTGAATC TTGTGTTCTG GTTCGCACG AGTTAGAATT TGTGTGAGTG ATTCAAATTT
      AP-1
-458   TGCTCACATA TTTTCCATGG ATTAATAATG GCTGGTTTTG CATAATTTTG GTTGTGTGGT
-398   CCTCATGCAG GATTTTTTTT CACGTACTTA TAAAAAATAA TTCTACAATC ACAAACACA
      MEF-2 Actin 5C-US
-338   ATCCTTTAAT CTGTGGAATA TATTTAACTC CATGACACCA GAACGTAAGG AAATTTAAGT
      AP-3 MEF-2
-278   AAGTGTCCTA CCTGTTCTGT TTATTGTTT TTGAGACTTT TTGTTTGATA AGATTCAACC
      Myo D
-218   TACGCATATT TAAAAATTG ATTAAATAT AACCAATTAA AAGTTTAAAT ACGGAAGTAT
      AP-1 CCAAT
-158   GAGCAAATTT CCAACATCAT CACATGCACC GTAATTTTTC GGATGTCTTA TCTCGAGCTG
      b-HLH

      -55
      *
-98    TTTGCACAGG AGGCGATATA AGCGCGTGAC ATGTTTTGTT CCTTACCAAT TCGCTTTGCT
      TATA
-38    TCTTGTGTACTTCTTTG/AT TGAGGCTCGA ATTCAAAT G
      Intrón Oligo 305 -1

```

Figura 24: Secuencia de nucleótidos de la región 5' del gen de la isoforma Act 302. Se muestra la secuencia de nucleótidos de la región 5' no traducida y de la secuencia promotora de la Act 302. Se ha numerado como nucleótido 1 la adenina del codon de iniciación ATG. El límite entre el primer y el segundo exón se indica mediante una línea diagonal. El oligonucleótido 305, empleado para el ensayo de extensión del cebador, se encuentra subrayado. El posible sitio de inicio de la transcripción, situado en la posición -55, se ha escrito en negrita y se designa mediante un asterisco. Las posibles secuencias reguladoras se han subrayado, indicándose debajo el nombre de dicha secuencia consenso o el del factor de transcripción que se une a cada región. También aparece subrayada la hipotética caja TATA.


```

-1362 AACTAGTGGG TCCCCCGGGT TGCAGGAATT CGATATCAAG CTTATCGATA CCGTCGACCT
      AP-2
-1302 GCAGGTCAAC GGATCTGCCT TCTGGCAAAA AATGCAAAAT TCCACATTTT TGATAGATAGG
-1242 AGCTCCAAAC TTCTACAGTA GGGTTCTCTG ATACGTTGAA TCTGATGGTG TGATTTTCGC
-1182 TAAGATTCTA TGACTTTTAG GGGGCGTCTC CCCCTATTTT CTAAAATAAC GCAAATTTTC
-1122 TCAGGCTCGT AACTTTTGGG TGGGTAAGAC TAAACTTGAT GAAACTTATA TATTTAAAAA
-1062 CCAGCATTAA AATGCGATTG TTTTATGTA ACTCTTGGT ATCCACACAC CGTCTTTTAT
-1002 AGATTTGGTT GCTATTGAGC GGGGTCGCTC CCTACCACAG TTCTTTACCA TGTGCTGTTT
      b-HLH
-942 GATGTAGAAA CCCTAGATAA TGCTCATTTC TAGAGCGTAA ATGTTACATC ACCATTTTGG
-882 GGACTTACGT ATTATCCAGA CCATACTCAA GTTCTCGATC TGAGTAAAAC CGGTTTCCCT
      AP-1
-822 GTCTCCATTC GGAGACAATT AGCTTAATCA GAGTGAGATA AACTCCCATC CAGGTGTATT
      b-HLH
-762 TTAATGAAAT ACTTATATAT AAAGTTGGTT AGGCTAGGTA TTAAATATAA TGCTTTCTGG
      MEF-2 SP-1
-702 GTGCCCCCT TTCCATGATT GTTTATTACA GTTCCCATAA TTAGGTAAC AAAATATTAC
      AP-2
-642 ATTTTCAGCA GATTTTGGTA TATTTCAAT TGACTAACAT AGCTATATTT CTGAGTGTA
      AP-1
-582 AGGGATAATA ACATTTCACT ACCACATTTC GTCTACGAAA ATCTGGAGA CACATTTAAAT
-522 ACTGATGGAA ATAAATTTTC AGACTCGCTG TTTCTTAAGG TGCATTTCCG TTTCGAGGTT
-462 TTACGAAAAA AAACATTTTC ATCAAATAAT AAGATAAATG GAAGTATTTT TCAACACAGC
-402 ACGGAAAAAG CAGGCTTTTC AATTGACTGG TTCGCTTGGT GTTTGGACAA TAAAACCCCA
      b-HLH
-342 AATGCAAAAC ACGGTATTAT TGATCCAAT AGTCTATAAA AGTACACAAG TCTGCCTAAA
      b-HLH Actin 5C-US
-282 TTACGGCATT TGTATCTTTT CTGATGTCAT CATCGTCAAT CCAAACCTCT TATCAGACTA
      b-HLH
-222 GCCAAACTTC TTATCCCACT AGTTGCTTTA AAGAAAGTTG TCAGCTCCTC ACTTCCTTTT
-162 ATTTTCAGAT GATGGTGCGT CAGCTTCCAA AAACATGACC ATATAAGGTA TTGCTTAGCT
      CArG
      -65 -64 -61 -60
      ** **
-102 CTTACAGTC AAAGACATGG AACGAGTAGT GAAATCGGGT TAGTCGTTT CTAGCTCTTC
-42 TCTTGTAAG/GTTTACTCAAG TCTTTACCAA CGTTAAATAA AAATG
      Intrón Oligo 404 -1

```

Figura 25: **Secuencia de nucleótidos de la región 5' del gen de la isoforma Act 403.** Se muestra la secuencia de nucleótidos de la región 5' no traducida y de la secuencia promotora de la Act 403. Se ha considerado como nucleótido 1 la adenina del codon de iniciación ATG. El límite entre el primer y el segundo exón se indica mediante una línea diagonal. El oligonucleótido 404, empleado para el ensayo de extensión del cebador, se encuentra subrayado. Los posibles sitios de inicio de la transcripción, situados en las posiciones (-60)- (-61) y (-64)- (-65), se han escrito en negrita y se denotan mediante asteriscos. Las posibles secuencias reguladoras se han subrayado, indicándose debajo el nombre de dicha secuencia consenso o el del factor de transcripción que se une a ella.

Las secuencias determinadas para estas posibles regiones promotoras de *Artemia* se han comparado con las contenidas en el banco de datos TFD de secuencias de unión a factores de transcripción (Ghosh, 1990), para detectar posibles regiones reguladoras de la transcripción. La comparación se realizó con el programa MacPattern (Fuchs, 1991). Los posibles sitios de unión encontrados que se han considerado más significativos se han subrayado en las Figuras 23, 24 y 25. Los posibles sitios de unión encontrados son de varias clases:

a) Secuencias de unión a factores generales:

En muchos promotores de eucariotas se ha descrito la presencia de las llamadas cajas TATA, secuencias de DNA para la unión a TFIID, uno de los factores implicados en la unión de la RNA polimerasa II. La caja TATA se localiza a una distancia de entre 20 y 30 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción. Según esto, la Act 211 (Figura 23) y la Act 403 (Figura 25), carecerían de una caja TATA canónica, mientras que la Act 302 (Figura 24), la tendría en la posición funcional descrita (Sawadogo, 1990). Los genes que carecen de caja TATA, suelen ser generalmente genes constitutivos en la célula y además presentan múltiples inicios de la transcripción (Muller et al., 1988).

Existen además en las actinas de *Artemia*, otras posibles secuencias de carácter general, como las cajas CCAAT, dominio al que se une la familia de factores de transcripción CTF (La Thangue y Rigby, 1990), AP1, AP2, AP3, Act 5C US o SP1 (Faisst y Meyer, 1992).

b) Secuencias de unión a factores específicos musculares:

- El primer grupo descrito de factores miogénicos fue el de los factores bHLH, que se unen a la secuencia consenso CANNTG, denominada caja E (Church et al., 1985). Esta caja se encuentra presente en las regiones reguladoras de muchos genes musculares. Los factores de transcripción del grupo bHLH actúan como homo o heterodímeros (French et al., 1991 y Jones, 1994), y a esta familia pertenecen: Myo D (Olson, 1990), Miogenina (Wright et al., 1989), Myf-5 (Winter et al., 1992) y Myf-6 (Braun et al., 1989). En el caso de las secuencias promotoras de actina en *Artemia*, se han encontrado 2 cajas E en la Act 211 (denominadas bHLH en las Figuras 23, 24 y 25), 4 cajas E en la Act 302, incluyendo una que es un sitio preferente de unión del factor Myo D y 5 cajas E en la Act 403. No se ha descrito ninguna proteína homóloga a Myo D en *Artemia*, pero sí existe un gen homólogo en otro invertebrado, el gen *nautilus* de *Drosophila melanogaster* (Michelson et al., 1990), lo que demuestra que esta familia de genes no está restringida a vertebrados y sugiere que pueda codificarse también en Crustáceos.

- Otro grupo de genes musculares se regulan a través de un segundo grupo de factores, de los cuales el más importante es MEF-2 (Gossett et al., 1989). Se han encontrado sitios de unión para el factor MEF-2 en los promotores de las actinas 302 (2 sitios) y 403 (1 sitio).

- Existen también otras secuencias consenso, identificadas inicialmente en las regiones promotoras de los genes de las α -actinas, cardíaca y esquelética, denominados cajas CArG. Su secuencia consenso es [CC(A+T)₆GG], (Miwa et al., 1987 y Minty y Kedes, 1986) y se ha encontrado en el promotor de la Act 403.

En resumen el análisis de las regiones 5' secuenciadas de las isoformas de actina muestra lo siguiente:

- Act 211: Carece de caja TATA. Presenta secuencias consenso generales y únicamente 2 cajas bHLH.
- Act 302: Presenta caja TATA, así como secuencias generales de unión. Aparecen además 4 dominios bHLH y 2 dominios MEF-2.
- Act 403: Carece de caja TATA y presenta las secuencias generales que aparecían en las otras dos isoformas. Además tiene 5 cajas bHLH, una secuencia MEF-2 y un dominio CArG.

En la Figura 26 se detalla el tamaño de la secuencia 5' analizada de cada isoforma, junto con la posición de las regiones consenso más representativas

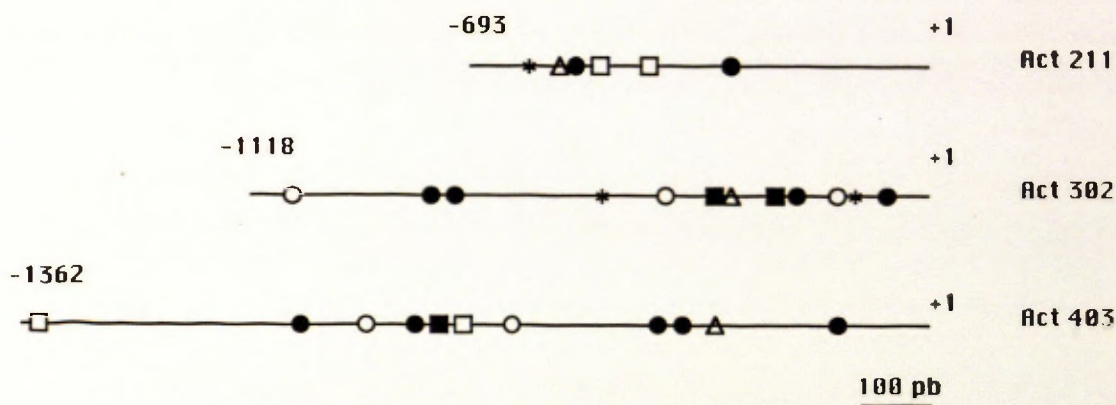


Figura 26: Posición de las posibles secuencias reguladoras dentro de las regiones promotoras de las tres isoformas de actina en *Artemia*. En este gráfico se esquematizan las regiones reguladoras correspondientes a las isoformas de actina de *Artemia*, Act 211, Act 302 y Act 403. En ellas se representan las secuencias consenso más representativas identificadas en una búsqueda comparativa sobre secuencias del banco de datos TFD (Ghosh, 1990). Los asteriscos corresponden a las cajas CCAAT. Los símbolos blancos señalan la posición de secuencias reguladoras generales: los círculos, AP1; los cuadrados, AP2 y los triángulos, Act 5C US. Los símbolos negros señalan la posición de secuencias reguladoras propias de factores miogénicos: los círculos, bHLH y los cuadrados, MEF-2.

4. ESTUDIOS EVOLUTIVOS. RELACIONES FILOGENETICAS.

Llevar a cabo un estudio evolutivo de los genes de actinas supone un análisis que incluye tanto la comparación de la posición de los intrones dentro de cada gen, como la elaboración de árboles filogenéticos obtenidos a partir de la secuencia de aminoácidos de cada proteína. La actina es una de las proteínas más estudiadas, por lo que existe una gran cantidad de información al respecto. Sin embargo, no habían sido descritas hasta este momento en ningún grupo de Crustáceos. La caracterización de las tres isoformas de actina de *Artemia* supone, por lo tanto, contar con un representante de este grupo animal que poder comparar con el resto de las actinas ya estudiadas.

4.1 Localización de los intrones dentro de los genes de actinas.

La caracterización estructural de los genes que codifican tres isoformas de actina de *Artemia* ha permitido determinar la posición de sus intrones. En la Figura 27, se muestra un cuadro comparativo de dichas posiciones. Las cajas blancas representan los exones codificantes y las cajas negras las regiones no codificantes, pudiendo éstas constituir un exón completo (5'UT), o bien formar parte de un exón con ambos tipos de secuencia. En el esquema se detallan además las posiciones de los aminoácidos 1 y 375, que constituyen el comienzo y el final de la proteína madura. Las posiciones en que los intrones interrumpen las secuencias

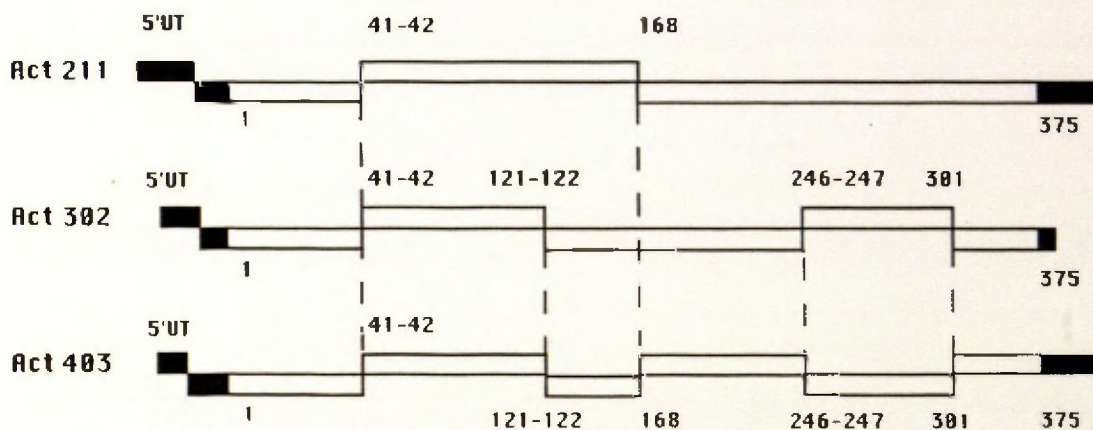


Figura 27: Cuadro comparativo de la posición de los intrones dentro de los genes Act 211, Act 302 y Act 403 de *Artemia*. Los exones de que consta cada gen se representan gráficamente como cajas dispuestas alternativamente sobre la línea central. Las cajas blancas corresponden a las regiones codificantes y las cajas negras a las regiones no codificantes. La numeración indica los aminoácidos correspondientes a la posición de cada intrón. Las líneas de trazo discontinuo unen la posición de los intrones que son comunes en al menos dos de los genes de actina. Sólo la posición del segundo intrón es la misma en las tres isoformas. Las tres isoformas presentan un exón no codificante en posición 5' de pequeño tamaño. La posición del resto de intrones es común en cada caso para dos de las isoformas.

codificantes, son las mismas en al menos dos de las tres isoformas. En las tres aparece un intrón en la región 5' no traducida. Intrones en esta región han sido descritos en una gran variedad de organismos, tanto protóstomos como deuteróstomos (Kleinsmith et al., 1984). El intrón en posición 41- 42 existe en las tres isoformas. El intrón en posición 121- 122 solamente existe en la Act 302 y Act 403. El intrón que se localiza en la posición 168, se encuentra en la Act 211 y Act 403, interrumpiendo la fase de lectura en el primer nucleótido del triplete. Entre los codones 246 y 247 aparece otra secuencia intrónica en las isoformas, Act 302 y Act 403. Finalmente, el intrón en posición 301, también en fase 1 como el 168, existe en las Act 302 y Act 403. En resumen, la Act 211 comparte la posición de 2 intrones con la Act 302 y 3 con la Act 403, mientras que las Act 302 y 403 comparten la posición de 5 intrones.

Una vez establecida la posición de los intrones en las actinas de *Artemia*, era muy interesante llevar a cabo un análisis comparativo con las diferentes posiciones descritas para otros organismos. Prácticamente todos los genes de actinas descritos hasta ahora presentan algún intrón, con algunas excepciones como son los genes musculares de *Bombix mori*, A1 y A2 (Mounier y Sparrow, 1993). Entre los que tienen al menos uno, se han establecido 40 posiciones diferentes de interrupción de la secuencia de la proteína (Weber y Kabsch, 1994). Al ser los genes de actinas de *Artemia* los primeros estudiados dentro del grupo de los Crustáceos, el interés del estudio comparativo lo hemos centrado en establecer analogías y diferencias, con otros grupos de Artrópodos como son los Insectos y con los genes de Vertebrados cuyo origen evolutivo ha sido muy estudiado (Hennessey et al., 1993). Esta comparación se muestra en la Figura 28, donde se ha representado la posición intrónica de las actinas de *Artemia* junto a la de dos Insectos: un Díptero (*Drosophila melanogaster*) y un Lepidóptero (*Bombix mori*), como representantes del grupo de los Invertebrados y la de los 6 tipos de actinas humanas, representativas del grupo de los Vertebrados. Además se ha incluido un representante del reino vegetal, *Arabidopsis thaliana*.

En la parte superior del cuadro, se muestra el número del codon en que aparece el intrón y entre paréntesis la posición que interrumpe en el triplete. La presencia de un intrón en la región 5' no traducida es prácticamente general: aparece en todas las actinas humanas, en cinco de las seis de *Drosophila melanogaster*, en una de las tres de *Bombix mori* y en todas las de *Artemia*. Otros intrones también se conservan mucho a lo largo de la evolución, como es el caso de los que interrumpen los codones 41 y 121, conservados entre *Artemia* y humanos pero no en Insectos, el que interrumpe el codon 150, entre humanos y muchas especies vegetales (Weber y Kabsch, 1994), y el que interrumpe el codon 204, entre humanos y equinodermos (Weber y Kabsch, 1994). Otros intrones son muy variables y algunos se han descrito únicamente en un organismo. *Artemia* comparte con otras especies los intrones situados en la zona 5' UT y en los codones 41 y 121. El intrón del codon 168 se ha descrito

únicamente en *Artemia* y en el nemátodo *Onchocerca volvulus*. El intrón del codon 246 solamente en *Artemia* y en el alga verde *Volvox carterii*. El intrón que interrumpe el codon 301 existente en las actinas 302 y 403, no había sido descrito hasta ahora en ningún organismo.

ORGANISMO	5'UT	13 (2)	17 (3)	41 (3)	84 (3)	116 (2)	121 (3)	158 (1)	168 (1)	204 (1)	246 (3)	267 (1)	301 (1)	307 (1)	327 (3)	353 (3)
<i>Arabidopsis th.</i>			+							+						+
H. α esquelético	+			+				+		+		+			+	
H. α cardíaco	+			+				+		+		+			+	
H. α liso vascular	+			+	+		+	+		+		+			+	
H. β citoplásmico	+			+			+					+			+	
H. γ citoplásmico	+			+			+					+			+	
H. γ liso entérico	+			+	+		+	+		+		+			+	
<i>Drosophila</i> 5C	+															
<i>Drosophila</i> 42R	+															
<i>Drosophila</i> 57B		+														
<i>Drosophila</i> 79B	+													+		
<i>Drosophila</i> 87E	+															
<i>Drosophila</i> 88F	+													+		
<i>Bombix mori</i> 1																
<i>Bombix mori</i> 2																
<i>Bombix mori</i> 3	+					+										
<i>Artemia</i> 211	+			+					+							
<i>Artemia</i> 302	+			+			+				+		+			
<i>Artemia</i> 403	+			+			+		+		+		+			

Figura 28: Cuadro comparativo general de la posición de los intrones en los genes de actina de diferentes organismos. En esta figura se indica la posición de los intrones en diversos genes de actinas. En la parte superior se indica el número del aminoácido correspondiente al codon de inserción del intrón. Entre paréntesis se indica la base del codon tras la que aparece el intrón. Como representante del reino vegetal se eligió la secuencia correspondiente a *Arabidopsis thaliana*, como representantes de vertebrados se usaron las 6 isoformas de actina humana. El resto corresponden a los genes conocidos de Insectos y Crustáceos. Las 6 isoformas de actina de *Drosophila melanogaster*, las 3 de *Bombix mori* y las isoformas Act 211, 302 y 403 de *Artemia*.

4.2 Análisis comparativo de las proteínas de actina de *Artemia*.

Establecer una relación filogenética entre las actinas de *Artemia* y las de otros organismos implica conocer la secuencia completa de aminoácidos de todas las isoformas. Hasta ahora solamente habían sido publicadas las secuencias completas de las actinas 205, 211 y 403 (Macías y Sastre, 1990). La Act 302, también descrita en la cita anterior carecía, como se ha dicho anteriormente, de los 49 aminoácidos del extremo amino terminal. Con esos datos, otros autores habían elaborado árboles filogenéticos (Hennessey et al., 1993 y Mounier y Sparrow, 1993), que incluían las tres primeras isoformas. Una vez obtenida la secuencia completa del gen y de la proteína de la Act 302 (apartado 2.2.1 de Resultados), fue posible establecer relaciones comparativas entre dicha isoforma y el resto de los genes caracterizados en los demás organismos.

En la Figura 29 se muestra la secuencia completa de nucleótidos y aminoácidos del cDNA de la Act 302. En negrita aparece la región codificante, el resto es secuencia no traducida 5' ó 3'. La Figura 30 presenta una comparación entre las 4 proteínas descritas en *Artemia*. En esta figura se muestra la secuencia de aminoácidos de las cuatro isoformas y sobre ellas se indican aquellas posiciones en las que alguna de las isoformas varía de las demás. Los aminoácidos en que no hay variación se designan mediante puntos, los cambios conservativos mediante barras y cuando el espacio está en blanco se trata de cambios no conservativos. Como puede verse el porcentaje de homología entre las 4 proteínas es superior al 94%, tal y como se describe en Macías y Sastre (1990). De los 21 cambios observados, el 81% son cambios conservativos y solamente el 19% son no conservativos.

4.3 Arbol filogenético.

Con objeto de determinar las distancias evolutivas entre las isoformas de actina de *Artemia* y las de otros organismos se analizó una selección de secuencias de actinas con el programa Clustal V (Higgins y Sharp, 1989). Las secuencias empleadas fueron las mismas que se usaron para la elaboración del cuadro comparativo general de intrones (Figura 28). El diseño del árbol se realizó posteriormente mediante el programa TreeDraw. Los resultados se muestran en la Figura 31. Todas las actinas examinadas presentan una disposición similar a la ya descrita por algunos autores en sus árboles filogenéticos (Hennessey et al., 1993). Según los datos del árbol, una rama llevaría a las actinas del reino vegetal, otra rama a las actinas musculares de Vertebrados, otra a las actinas citoplásmicas de Vertebrados y finalmente otra a las actinas de Invertebrados. Evolutivamente, las actinas citoplásmicas de Vertebrados se aproximarían más que las musculares a las actinas de Invertebrados. Dentro de las actinas de Invertebrados, las Act 205 y 211 de *Artemia* estarían muy próximas evolutivamente y se

Act 302

1	TACCAATTGCGTTTGCTTCTGTGTTTACTTCTTTGATTGAGGCTCGAATTTCAA																										
	Met	Cys	Asp	Asp	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Val	Asp	Asn	Gly	Ser	Gly	Met									17	
56	ATG	TGT	GAC	GAC	GAG	GTA	GCT	GCA	TTG	GTT	GTT	GAC	AAT	GGA	TCT	GGA	ATG										
	Cys	Lys	Ala	Gly	Phe	Val	Gly	Asp	Asp	Ala	Pro	Arg	Ala	Val	Phe	Pro	Ser										34
107	TGT	AAG	GCT	GCT	TTT	GTC	GCT	GAC	GAT	GCC	CCC	CGT	GCT	GTT	TTT	CCT	TCG										
	Ile	Val	Gly	Arg	Pro	Arg	His	Gln	Gly	Val	Met	Val	Gly	Met	Gly	Gln	Lys										51
158	ATT	GTT	GCT	CGT	CCA	CGT	CAT	CAG	GCT	GTC	ATG	GTT	GCT	ATG	GCC	CAA	AAA										
	Asp	Ser	Tyr	Val	Gly	Asp	Glu	Ala	Gln	Ser	Lys	Arg	Gly	Ile	Leu	Thr	Leu										68
209	GAT	AOC	TAT	GTC	GCT	GAT	GAG	OCT	CAG	AOC	AAA	COT	GCT	ATT	CTT	ACC	CTC										
	Lys	Tyr	Pro	Ile	Glu	His	Gly	Val	Val	Thr	Asn	Trp	Asp	Asp	Met	Glu	Lys										85
260	AAA	TAC	CCA	ATC	GAG	CAC	GCT	GTT	GTC	ACT	AAC	TGG	GAT	GAT	ATG	GAA	AAG										
	Ile	Trp	His	His	Thr	Phe	Tyr	Asn	Glu	Leu	Arg	Val	Ala	Pro	Glu	Glu	His										102
311	ATT	TGG	CAT	CAT	ACC	TTT	TAC	AAT	GAG	CTT	CGT	GTT	GCT	CCA	GAA	GAA	CAC										
	Pro	Val	Leu	Leu	Thr	Glu	Ala	Pro	Leu	Asn	Pro	Lys	Ala	Asn	Arg	Glu	Lys										119
362	CCC	GTC	CTC	CTG	ACA	GAG	OCT	CCC	TTG	AAC	CCA	AAA	GCC	AAT	AGA	GAA	AAA										
	Met	Thr	Gln	Ile	Met	Phe	Glu	Thr	Phe	Asn	Thr	Pro	Ala	Met	Tyr	Val	Ala										136
413	ATG	ACA	CAA	ATT	ATG	TTT	GAA	ACC	TTC	AAC	ACC	CCA	GCA	ATG	TAC	GTT	GCC										
	Ile	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Thr	Gly	Ile	Val										153
464	ATT	CAA	GCT	GTT	CTC	TCG	CTT	TAT	GCG	TCA	GCT	CGT	ACA	ACT	GCT	ATA	GTA										
	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Gly	Val	Ser	His	Thr	Val	Pro	Ile	Tyr	Glu	Gly	Tyr										170
515	CTT	GAT	TCT	GGA	GAT	GCG	GTA	TCT	CAT	ACC	GTT	CCC	ATC	TAT	GAA	GCT	TAT										
	Ala	Leu	Pro	His	Ala	Ile	Leu	Arg	Leu	Asp	Leu	Ala	Gly	Arg	Asp	Leu	Thr										187
566	GCC	CTC	CCC	CAT	GCT	ATT	CTT	CGT	CTT	GAT	CTG	GCT	GCT	CGT	GAC	CTT	ACA										
	Asp	Tyr	Leu	Met	Lys	Ile	Leu	Thr	Glu	Arg	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Thr										204
617	GAC	TAC	CTG	ATG	AAG	ATT	CTT	ACT	GAA	AGA	GCC	TAC	ACT	TTC	ACT	ACT	ACA										
	Ala	Glu	Arg	Glu	Ile	Val	Arg	Asp	Ile	Lys	Glu	Lys	Leu	Cys	Tyr	Val	Ala										221
668	GCA	GAA	AGA	GAA	ATA	GTT	CGT	GAT	ATC	AAA	GAG	AAG	CTA	TGC	TAT	GTA	GCC										
	Leu	Asp	Phe	Glu	Gln	Glu	Met	Ala	Thr	Ala	Ala	Ser	Ser	Thr	Ser	Leu	Glu										238
719	CTT	GAT	TTT	GAA	CAA	GAG	ATG	GCC	ACA	GCC	GCA	AGC	TCA	ACT	TCT	CTC	GAG										
	Lys	Ser	Tyr	Glu	Leu	Pro	Asp	Gly	Gln	Ile	Ile	Thr	Ile	Gly	Asn	Glu	Arg										255
770	AAG	AGT	TAT	GAG	CTT	CCT	GAT	GGA	CAG	ATT	ATT	ACC	ATT	GCT	AAT	GAA	GGA										
	Phe	Arg	Cys	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Gln	Pro	Ser	Phe	Leu	Gly	Met	Glu	Thr										272
821	TTC	CGT	TGT	CCA	GAA	GCA	CTA	TTC	CAA	CCA	TCT	TTC	TTA	GGA	ATG	GAA	ACT										
	Cys	Gly	Ile	His	Glu	Thr	Ala	Tyr	Asn	Ser	Ile	Met	Lys	Cys	Asp	Val	Asp										289
872	TGT	GCT	ATC	CAC	GAA	ACT	GCT	TAC	AAT	AGC	ATC	ATG	AAA	TGT	GAC	GTA	GAT										
	Ile	Arg	Lys	Asp	Leu	Tyr	Ala	Asn	Thr	Val	Leu	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr	Met										306
923	ATC	AGG	AAG	GAC	TTG	TAT	GCC	AAC	ACA	GTA	CTT	TCA	GCT	GCT	ACT	ACC	ATG										
	Phe	Pro	Gly	Ile	Ala	Asp	Arg	Met	Gln	Lys	Glu	Ile	Thr	Met	Leu	Ala	Pro										323
974	TTT	CCT	GCT	ATT	GCT	GAT	CGT	ATG	CAG	AAG	GAA	ATA	ACC	ATG	CTT	GCA	CCA										
	Ser	Ser	Met	Lys	Ile	Lys	Ile	Ile	Ala	Pro	Pro	Glu	Arg	Lys	Tyr	Ser	Val										340
1025	TCT	TCA	ATG	AAA	ATT	AAA	ATC	ATT	GCC	CCA	CCT	GAA	GCC	AAA	TAC	TCT	GTT										
	Trp	Ile	Gly	Gly	Ser	Ile	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Phe	Gln	Gln	Met	Trp										357
1076	TGG	ATT	GGA	GCG	TCT	ATT	CTT	GCA	TCT	CTG	TCT	ACA	TTC	CAA	CAG	ATG	TGG										
	Ile	Ser	Lys	Gln	Glu	Tyr	Asp	Glu	Ser	Gly	Pro	Ser	Ile	Val	His	Arg	Lys										374
1127	ATC	TCT	AAG	CAG	GAA	TAT	GAC	GAA	TCT	GCG	CCA	TCA	ATC	GTC	CAT	AGA	AAA										
	Cys	Phe	Stop																								376
1178	TGC	TTC	TAA	ATTTTGTTAATTCTTTTCATTCTAAATGACTTGCCCGTAAAAA																							

Figura 29: Secuencia completa de nucleótidos y aminoácidos del cDNA de la Act 302 de *Artemia*. En la figura se presenta la secuencia de 1234 pb correspondiente al cDNA de la Act 302, proveniente de la yuxtaposición de la secuencia del producto del PCR anclado (nt 1 al 35), de los exones 2 y 3 del fago genómico λ gArAct22 (nt 36 al 200) y del clon de cDNA pArAct302 (desde el nt 201 hasta el final). En letra negra aparece la región codificante, el resto corresponde a regiones no traducidas 5' y 3'. Mediante el código de tres letras se presenta la secuencia deducida de 376 aminoácidos de la proteína.

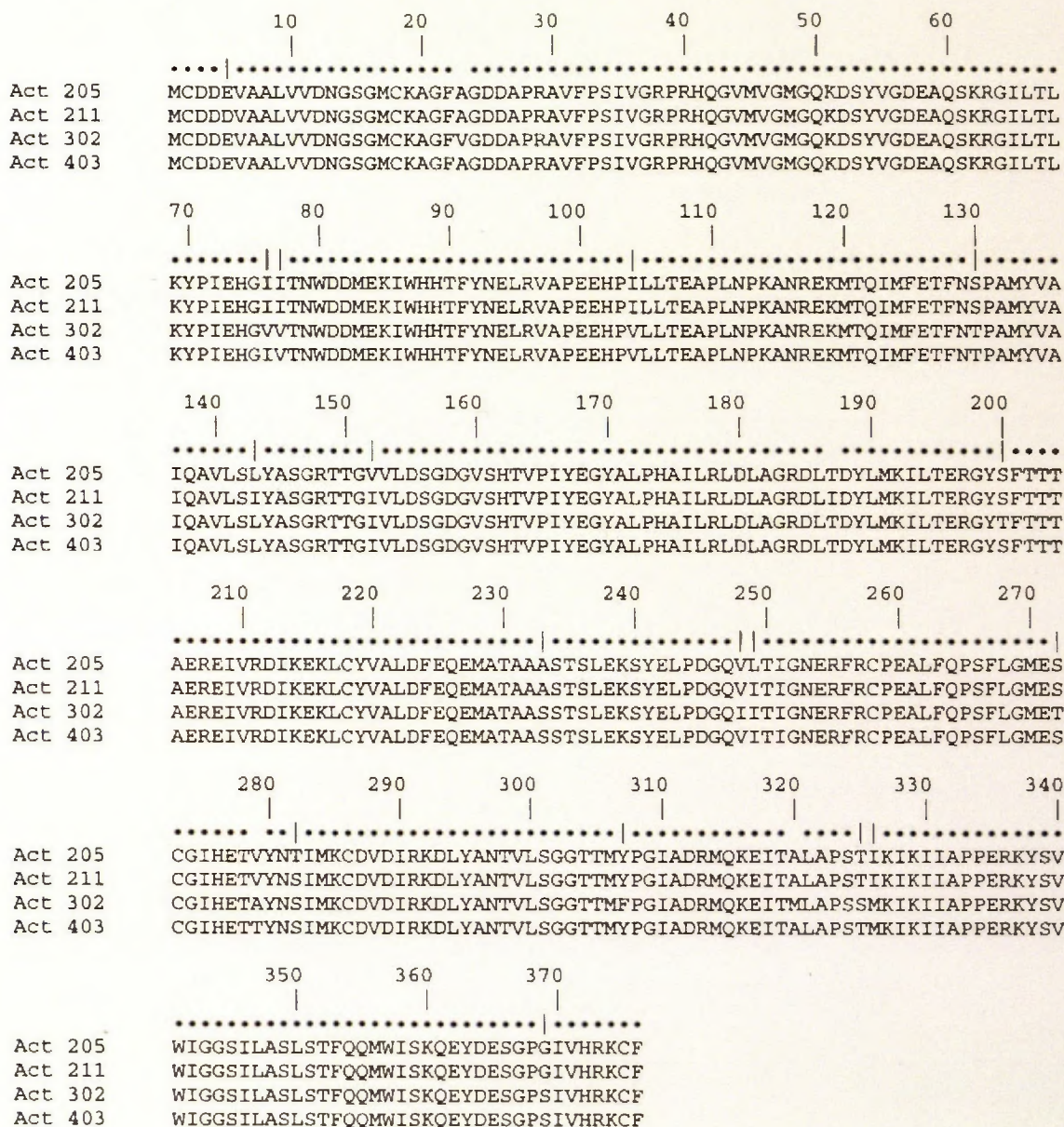


Figura 30: Esquema comparativo de la secuencia de aminoácidos de las cuatro proteínas de actina descritas en *Artemia*. En esta representación se compara la secuencia de aminoácidos de las cuatro proteínas de actina de *Artemia*. Los números sobre las secuencias señalan la posición de los aminoácidos dentro de la proteína. Los aminoácidos en que no existe variación se designan mediante puntos, mientras que las líneas verticales corresponden a cambios conservativos y un espacio en blanco a cambios no conservativos.

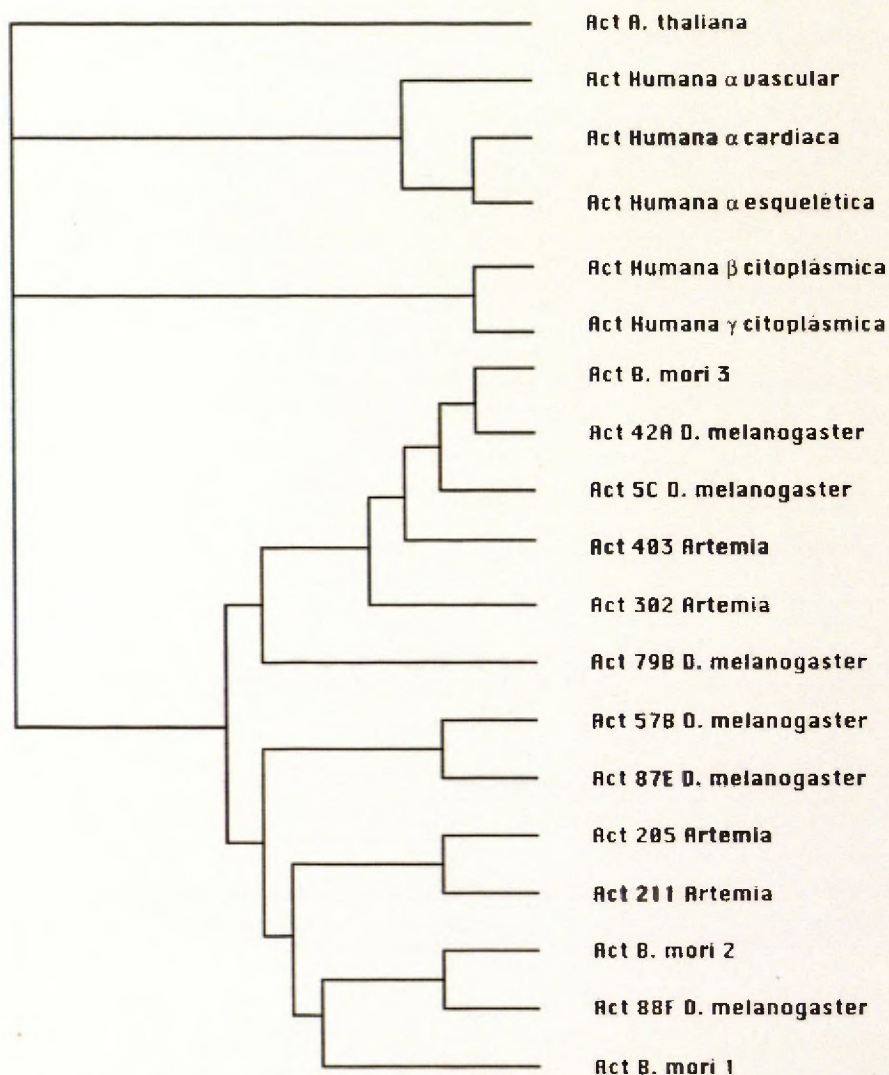


Figura 31: **Arbol filogenético.** Se ha utilizado una selección de secuencias de actinas provenientes del banco de datos SWISS-PROT, Protein Sequence Database para elaborar un árbol filogenético mediante el programa Clustal V (Higgins y Sharp, 1989). El árbol presenta cuatro ramas: la de las actinas vegetales (*Arabidopsis thaliana*), la de las actinas musculares de vertebrados (actinas α vascular, α cardíaca y α esquelética humanas), la de las actinas citoplásmicas de vertebrados (actinas β y γ humanas) y la de las actinas de invertebrados. Las Act 205 y Act 211 de *Artemia* se engloban en el árbol junto a las actinas musculares de Insectos (actinas 57B, 87E y 88F de *Drosophila melanogaster* y Actinas 1 y 2 de *Bombix mori*) y las Act 302 y Act 403 lo hacen junto a las actinas citoplásmicas de este grupo de Artrópodos (Act 42A y 5C de *Drosophila melanogaster* y Act 3 de *Bombix mori*).

englobarían dentro de la rama que contiene las actinas musculares de Insectos. Por el contrario, las Act 302 y 403, se encontrarían dentro de la rama de actinas de Insectos consideradas como citoplásmicas. Los datos obtenidos mediante la hibridación *in toto* indicaron que las actinas 211 y 403 son citoplásmicas mientras que la Act 302 es muscular (ver apartado 1.2 de los resultados). Estos datos pudieran indicar, que la especialización tisular que han seguido los genes de actina en Crustáceos no ha sido la misma que han seguido en Insectos. Esto explicaría que la Act 211, citoplásmica según los datos de hibridación *in toto*, se englobe en el árbol junto a las actinas musculares de Insectos mientras que la Act 302, muscular, lo haga dentro de las citoplásmicas de Insectos.

DISCUSSION

DISCUSION.

1. EXPRESION TEMPORAL Y ESPACIAL DE TRES ISOFORMAS DE ACTINA EN *Artemia*.

En la presente Tesis Doctoral se ha abordado el estudio de tres de los genes de actina en *Artemia*. Este proyecto se engloba en uno más general enfocado a conocer los mecanismos que regulan la transcripción en este organismo. Como se describió en la Introducción, el embrión de *Artemia* tiene la peculiaridad de que, al llegar a la fase de gástrula, puede enquistarse si las condiciones ambientales son adversas para su crecimiento. Al enquistarse se deseca y entra en una fase de criptobiosis en la que toda actividad metabólica, incluyendo la transcripción, cesa. Al reactivarse, el embrión reanuda su actividad metabólica y su desarrollo embrionario. La comparación de estas dos situaciones extremas puede ser muy útil para el estudio de los mecanismos que activan la transcripción tras la hidratación del quiste, así como de los que mantienen la transcripción inhibida durante el período de enquistamiento.

El interés particular del estudio de los genes de actina radica en que constituyen una familia génica cuyas secuencias codificantes están muy conservadas, pero la expresión de cada isoforma se encuentra regulada en cuanto a su especificidad de tejido y momento de expresión durante el desarrollo. Estas características hacen que sean genes interesantes para estudiar los mecanismos, espaciales y temporales, que regulan su transcripción. El primer paso en el estudio de los genes de actina de *Artemia* ha sido caracterizar su especificidad de expresión tisular y sus niveles de expresión durante el desarrollo.

El análisis de la expresión espacial de las tres isoformas de actina en *Artemia* se ha llevado a cabo mediante hibridaciones *in toto* con sondas de oligonucleótidos específicos para cada una de ellas. Era importante efectuar este estudio ya que se desconocía el carácter citoplásmico o muscular que pudieran presentar dichas isoformas. La expresión espacial de las actinas en Vertebrados se encuentra muy bien establecida (Vandeckerckhove y Weber, 1978 y 1979). En Invertebrados, sin embargo, se conoce muy poco de los diferentes grupos que lo integran, a excepción de un grupo de Artrópodos, los Insectos, donde un Díptero (*Drosophila melanogaster*) (Fyrberg et al., 1983) y un Lepidóptero (*Bombix mori*) (Mounier y Prudhomme, 1991 y Mounier y Sparrow, 1993), han sido objeto de múltiples estudios en este sentido. Las hibridaciones *in toto* que se realizaron con las tres isoformas de actina en *Artemia* dieron como resultado la existencia de 2 isoformas citoplásmicas (Act 211 y Act 403) y una isoforma muscular (Act 302). Los resultados de estos experimentos sugieren que la Act 211 se expresa en el ectodermo y mesodermo de la nauplia y la Act 403 preferentemente en el ectodermo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que resulta complejo y arriesgado atribuir una hibridación a una determinada capa embrionaria en animales enteros, sobre todo cuando se trata de genes

con una expresión tan generalizada como las actinas citoplásmicas. La asignación de la hibridación de las sondas Act 211 y Act 403 a estas capas embrionarias necesitaría ser confirmada mediante otras técnicas como podrían ser el análisis de cortes seriados a partir de un sistema de microscopía confocal, o bien mediante hibridaciones *in situ* realizadas sobre criocortes histológicos. La técnica de hibridaciones *in situ* ya se ha llevado a cabo en nuestro laboratorio con resultados positivos para otros genes como la Na/K ATPasa o la Ca ATPasa de retículo sarco/endoplásmico. Sin embargo, las sondas de las tres isoformas de actina no han dado resultados concluyentes, por lo que el problema pudiera deberse a las peculiaridades propias de estos genes.

La expresión de la Act 302 se observa únicamente, por el contrario, en el sistema muscular de la nauplia, sistema mandibular y natatorio. Estos datos de expresión tisular estarían de acuerdo con los descritos para la expresión temporal, ya que las dos actinas caracterizadas como citoplásmicas (Act 211 y Act 403) comienzan a expresarse desde el inicio del desarrollo embrionario mientras que la isoforma muscular (Act 302) lo hace a partir de las 10-12 horas, cuando se observan por primera vez (mediante métodos histoquímicos) células musculares (Raineri, 1989).

Aunque estos tres genes de actina probablemente representan las isoformas mayoritarias en larvas de *Artemia*, es posible que se expresen otras isoformas a niveles más bajos o en otros estadios del desarrollo puesto que el número de genes de actina se ha estimado en 8-10 (Macias y Sastre, 1990). De hecho, se ha descrito un clon de cDNA que codifica para otra isoforma de actina, Act 205, que se expresa a niveles muy bajos y constantes durante el desarrollo por lo que no ha sido objeto de esta tesis. Existen, por tanto, otras isoformas de actina en *Artemia* por lo que podría haber más de una isoforma muscular, como se ha descrito en Insectos.

Se ha estudiado también el patrón temporal de expresión del mRNA de las tres isoformas de actina durante el desarrollo embrionario y larvario de *Artemia*. Una dificultad importante a la hora de desarrollar este trabajo ha sido la imposibilidad de conseguir información a través de métodos directos, como el marcaje metabólico, debido a la impermeabilidad del quiste (de Chaffoy et al., 1978). Sin embargo, la disponibilidad de sondas específicas para estos genes posibilita el estudio de su expresión mediante ensayos de Northern-blot, incluso en el período de desarrollo embrionario en el que los quistes son impermeables. Una limitación de este método de estudio es que los niveles de mRNA detectados no reflejan exclusivamente la síntesis de mRNA, sino también su degradación. A pesar de ello, un incremento en los niveles de un mRNA implica necesariamente una transcripción activa aunque su síntesis pudo haber comenzado antes de observar el aumento de nivel estacionario. Por lo tanto, los datos de expresión de las tres isoformas de actina de *Artemia* presentados en los Resultados (apartado

1.1), deben interpretarse en el sentido de que cuando se observa un incremento en los niveles de mRNA con seguridad la síntesis de RNA está teniendo lugar, aunque pudo haber comenzado en estadios previos del desarrollo. Es decir, este estudio permite conocer en que momento del desarrollo se encuentran activos los promotores específicos de cada uno de los genes.

La expresión de las tres isoformas de actina caracterizadas en este trabajo se induce durante el desarrollo embrionario de *Artemia*. Los mRNAs que codifican para las Act 211 y Act 403 están presentes a niveles bajos en el quiste y se inducen durante el desarrollo embrionario. Ya que en el quiste no hay transcripción, estos resultados indican que estos transcritos forman parte de la población de mRNAs almacenados que pueden proceder tanto de origen materno como de transcripción del embrión en una etapa previa al enquistamiento en la fase de gástrula. La expresión de ambas isoformas se incrementa fundamentalmente a partir de las 6 horas de desarrollo. En cambio, el mRNA de la Act 302 no está presente en el quiste y no se observan valores detectables hasta las 12 horas de desarrollo, aumentando linealmente en estadios posteriores.

Además de la Act 211 y Act 403, otros genes de *Artemia* aumentan sus niveles de expresión entre las 6 y las 16 horas de desarrollo como una isoforma de la subunidad α de la Na/K ATPasa (Sastre et al., 1989), la subunidad β de la Na/K ATPasa (Bhattacharyya et al., 1990) o la Ca-ATPasa de retículo sarco/endoplásmico (Palmero y Sastre, 1989). Estos datos indican que el principal incremento en la transcripción génica no es un suceso temprano en el desarrollo de los quistes de *Artemia*. Se ha descrito que la activación de los quistes de *Artemia* es un proceso reversible en las 4 primeras horas tras la hidratación de modo que, si se produce una nueva deshidratación durante este periodo los quistes vuelven al estado de criptobiosis sin perder su viabilidad (Morris, 1971). Por lo tanto, ningún proceso de tipo irreversible se iniciaría en las 4 primeras horas de desarrollo, lo que estaría de acuerdo con los datos obtenidos en la expresión de estas dos isoformas de actina (Act 211 y Act 403), en que la principal activación se observa después de las 6 horas de desarrollo. El pequeño incremento en los niveles de mRNA observado para la Act 403 en las primeras horas de desarrollo podría representar una activación transitoria de la transcripción, de acuerdo con esta interpretación.

Es posible proponer una hipótesis acerca de los mecanismos de activación de la transcripción génica a partir de estos datos. Como se mencionó en la Introducción se desconoce cómo se encuentra reprimida la transcripción en el quiste, ya que se detectan RNA polimerasas funcionales (Osuna y Sebastián, 1980). Una posible explicación podría ser la existencia de un mecanismo general de represión de la transcripción que se inactivaría cuando se produce la hidratación de los quistes. Este posible mecanismo de represión podría ser, por ejemplo, una conformación inactiva de la cromatina o la carencia de algún factor de transcripción

de carácter general. Si esta hipótesis es correcta, se podría esperar que la activación de la transcripción génica dependiese de la eliminación de ese mecanismo represor y que fuera simultánea, al menos, para todos aquellos genes con transcripción generalizada en todas las células. Entre estos genes podríamos considerar a las dos isoformas de actina caracterizadas como isoformas citoplásmicas, Act 211 y Act 403. Los datos obtenidos en los niveles de mRNA de estas dos isoformas no están, sin embargo, de acuerdo con esta hipótesis, ya que se observan diferencias de varias horas en el tiempo de acumulación de los mRNAs entre estos genes. Estos resultados sugieren que además de un mecanismo general de activación de la transcripción debe de existir algún tipo de mecanismo específico de cada gen. No puede excluirse la posibilidad de que exista un mecanismo general de represión de la transcripción pero, incluso existiendo, su inactivación no sería suficiente para la activación génica y se requerirían posiblemente factores adicionales específicos de gen.

La activación de la transcripción de la Act 302 posiblemente sea dependiente de diferenciación de tejido y no solamente de la activación del embrión enquistado, por lo que se esperaría que no fuese simultánea con el resto de genes expresados en todas las células. De hecho, los otros genes específicos de tejido caracterizados en *Artemia*, las globinas (Manning et al., 1990) y la isoforma α -2850 de la subunidad α de la Na/K ATPasa (Sun et al., 1992) no se expresan en el quiste y sus mRNAs se acumulan tarde en los embriones.

Como resumen de los resultados obtenidos en el estudio de la expresión temporal y espacial de las tres isoformas de actina podríamos decir que se ha identificado una isoforma muscular y dos citoplásmicas y se ha observado que la expresión de las tres isoformas se induce durante el desarrollo. Estos resultados confirman el interés del estudio de la regulación de la expresión de estos tres genes durante la activación y el desarrollo del quiste de *Artemia*. Nos permiten, además, definir los estadios de desarrollo en los que la transcripción de estos genes está activa.

2. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LOS GENES DE TRES ISOFORMAS DE ACTINA EN *Artemia*. ESTUDIO DE SUS REGIONES REGULADORAS.

Para llevar a cabo el estudio de las regiones reguladoras de las tres isoformas de actina de *Artemia* ha sido necesario el aislamiento de los clones genómicos que contuvieran los genes correspondientes. Este estudio ha permitido caracterizar estructuralmente los genes de las tres isoformas de actina. En este estudio se han aislado clones provenientes de dos genotecas genómicas diferentes. Al analizar los clones provenientes de la primera de ellas se pudo comprobar que la secuencia de nucleótidos variaba en un 4-5% de la determinada en los clones de cDNA. Otros estudios efectuados con los quistes a partir de cuyo DNA se hizo la genoteca

hacen pensar que proceden de una mezcla de *Artemia franciscana* y *Artemia parthenogenetica* (Gallego et al., 1986). Los clones de cDNA así como la segunda genoteca genómica, proceden de una población de *Artemia franciscana*. La diferencia de secuencia entre los clones de cDNA y los clones de la primera genoteca genómica podrían reflejar la divergencia evolutiva entre estas dos especies de *Artemia*. La divergencia de secuencia entre estas especies observada para genes mitocondriales es del 15-20% (Pérez et al., 1994), dato compatible con la divergencia de los clones de actina, dada la mayor frecuencia de mutación del DNA mitocondrial. A pesar de esta divergencia de secuencias, la región genómica que se ha estudiado en fagos de ambas genotecas, como es el caso de los exones 3 y 4 de la Act 302, tiene la misma estructura en ambas especies por lo que pensamos que los datos obtenidos para los tres genes de actina tienen validez para las dos especies.

La isoforma Act 211 es el gen de actina más largo dentro del genoma de *Artemia* de entre los tres caracterizados, 14.7 kb. El gen de la isoforma Act 403, con 13.1 kb, presenta un tamaño intermedio y el de la Act 302 con 10.5 kb es el más pequeño. El tamaño de los genes de actina es muy variable dependiendo de los organismos, e incluso dependiendo de las diferentes isoformas dentro de una misma especie. Así, por ejemplo, los seis genes diferentes que codifican por actinas en humanos presentan valores que van desde las 2.8 kb únicamente del gen de la γ -actina citoplásmica a las 27 kb del gen de la γ -actina de músculo liso, tipo entérico (Miwa et al., 1991).

Por lo que se refiere a la estructura de estos genes, el gen Act 211 está dividido en 4 exones, separados por 3 intrones, el de la Act 302 en 6 exones con 5 intrones y el de la Act 403 en 7 exones y 6 intrones. El número de intrones en los genes de actina en otras especies varía desde cero, en los genes A1 y A2 de *Bombix mori*, a nueve, en el único gen de actina del alga verde *Volvox carterii* (Weber y Kabsch, 1994). En general, el número de intrones es mucho más alto en deuteróstomos que en protóstomos. *Artemia* con 3, 5 y 6 en las isoformas Act 211, Act 302 y Act 403 respectivamente presenta un número altísimo de intrones si lo comparamos con los genes de actina descritos en Insectos. Las actinas A1 y A2 de *Bombix mori* no presentan ningún intrón, las actinas 5C, 42A, 57B y 87E de *Drosophila melanogaster* presentan uno y las actinas 79B y 88F de *Drosophila melanogaster* presentan dos.

El tamaño de los intrones varía desde 0.8 kb en el quinto intrón de la Act 302, a 6.8 kb del primer intrón de la Act 211, con un tamaño medio de 2.45 kb. Las tres isoformas presentan un intrón en posición 5' no codificante. Este intrón es muy grande en la Act 211 (6.8 kb), muy pequeño en la Act 403 (0.5kb) y presenta un valor intermedio en la Act 302 (3.9kb). Estos valores son similares a los que encontramos en las actinas humanas, con tamaños de intrones desde sólo 56 pb (quinto intrón de la α -actina de músculo esquelético) a 7.5 kb del primer intrón situado en la zona 5' no codificante de la isoforma γ -actina del músculo liso, tipo entérico (Miwa

et al., 1991). En definitiva, la característica que define el tamaño de los intrones es su elevada variabilidad.

En cuanto al tamaño de los exones, la variabilidad es la misma que la que presentan los intrones. Una característica común para las tres isoformas de actina de *Artemia* es la presencia de un primer exón de pequeño tamaño en la región 5' no codificante. En la isoforma Act 211 tiene 55 pb, en la Act 302, 35 pb y en la isoforma Act 403 solamente 31 pb. Esta peculiaridad ha sido descrita en invertebrados para 5 de las 6 isoformas de actina de *Drosophila melanogaster* (la isoforma muscular 57B carece de él) y una de las tres de *Bombix mori* (las isoformas musculares A1 y A2 no lo presentan) (Mounier y Sparrow, 1993). En vertebrados se ha encontrado también en los 6 tipos de actinas humanas (citoplásmicas y musculares) (Miwa et al., 1991) y en todas las isoformas de rata (Kleinsmith et al., 1984). Los exones codificantes varían en tamaño entre las 138 pb del exón 4 de la Act 403 hasta las 801 pb del exón 4 de la Act 211. El tamaño medio de los exones es de 233 pb para los tres genes de actina.

Los tamaños medios de los intrones y exones de los genes de actina (2.45 kb y 233 pb respectivamente) son similares a los encontrados en otros genes de *Artemia*, como son la ATPasa de Ca de retículo sarco/endoplásmico (3.6 kb y 230 pb, respectivamente) (Escalante y Sastre, 1994) o la subunidad α de la ATPasa de Na/K (3.3 kb y 241 pb, respectivamente) (García-Sáez y Sastre, comunicación personal). Comparada con otros organismos, la estructura de los genes de *Artemia* es más parecida a la de los genes de Vertebrados que a la de los genes de Insectos. Por ejemplo, el tamaño medio de los intrones es mucho mayor en *Artemia* (2.45 kb para los genes de actina) que en Insectos (0.62 kb), pareciéndose más al de Vertebrados (1.1 kb) (Hawkins, 1988). El tamaño medio de los exones es intermedio en *Artemia* (233 pb en los genes de actina) entre los Insectos (392 pb) y los Vertebrados (137 pb) (Hawkins, 1988). En general, en *Artemia* parecen existir más exones que en Insectos, de menor tamaño y separados por intrones más largos. Comparando con Vertebrados, *Artemia* parece tener menos exones, ligeramente más largos, pero separados por intrones mayores.

Una vez conocida la estructura tridimensional de la molécula de actina (Kabsch et al., 1990) ha sido posible establecer un análisis de la posición de los intrones en la estructura de la proteína (Weber y Kabsch, 1994). Actualmente se conocen 40 posiciones diferentes de inserción de intrones a lo largo de la secuencia de actina en los distintos organismos en los que ha sido descrita. El número de posiciones en que los intrones se insertan al inicio o al final de la secuencia codificante para una estructura secundaria elemental (α -hélice o lámina β) es aproximadamente la mitad del total, correspondiendo el resto a aquellos intrones que se encuentran incluidos en alguna de estas estructuras. Estos datos pueden explicarse con inserciones arbitrarias de los intrones, no existiendo una relación directa entre la organización del gen y la estructura de la proteína. En *Artemia*, como se detalló en el apartado 4.1 de los

Resultados, se han encontrado intrones en 5 posiciones diferentes a lo largo de la secuencia de la proteína. El intrón en posición 41-42, común con otros organismos, se localiza en la estructura secundaria en el lazo situado entre dos láminas β . El intrón en posición 121-122, también frecuente en otros organismos, aparece situado en la posición media de una α -hélice. El intrón en posición 168 únicamente descrito en el nemátodo *Onchocerca volvulus* y en *Artemia*, se sitúa en un lazo entre dos láminas β . El intrón en posición 246-247, descrito sólo en *Artemia* y en el alga verde *Volvox carterii* está situado en un lazo entre dos láminas β . Por último, el intrón en posición 301, que no había sido descrito hasta ahora en ningún otro organismo y aparece en las isoformas Act 302 y Act 403, se sitúa en un lazo entre una lámina β y una α -hélice.

Los tres genes caracterizados de actina no parecen estar próximamente agrupados en el genoma, puesto que sus mapas de restricción no coinciden en ninguna región. Se ha obtenido, sin embargo, alguna evidencia de agrupamiento de genes de actina en *Artemia*. El clon genómico (λ gArAct 22) que contiene, como se detalló en el apartado 2.2.1 de Resultados, los 4 últimos exones de la Act 302, presenta además unas 11 Kb de DNA genómico 3' respecto al último exón de este gen. Esta región hibridó perfectamente con los oligonucleótidos 13 y 15, situados ambos en la región 5' de los genes de actinas (Figuras 6A y 12A respectivamente), lo que podría interpretarse como prueba de la existencia de otro gen de actina contiguo al de la Act 302. Agrupamientos de genes de actinas han sido descritos en organismos como *D. discoideum*, *S. purpuratus* o *S. franciscanis* (Kleinsmith et al., 1984). También se ha descrito en Tunicados (Kusakabe et al., 1992). Los genes de actina se encuentran, sin embargo, dispersos en el genoma de *Drosophila melanogaster* (Fyrberg et al., 1980) y en el humano (Engel et al., 1981). Continuar este estudio en *Artemia*, hubiese implicado la secuenciación de esta región hasta llegar a la zona 3' no traducida para determinar cual de las isoformas se situaba 3' respecto a la Act 302. Una estimación por Southern-blot del número de genes de actina en *Artemia* fue de 8 a 10, según se describe en Macías y Sastre (1990), por lo que esta hipotética actina podría tratarse de una isoforma no caracterizada y su análisis debería comenzar clonando el cDNA correspondiente. Un problema de tiempo nos impidió continuar en aquel momento con dicho abordaje, muy interesante por otro lado, ya que de existir ese gen de actina contiguo, contaríamos con la región reguladora ya clonada. Podríamos así compararla con la región promotora del gen Act 302, estableciendo posibles homologías ya que, en los agrupamientos de genes, las secuencias reguladoras suelen haberse conservado evolutivamente (Kleinsmith et al., 1984).

La determinación de los sitios de inicio de la transcripción para las tres isoformas de actina descritas en *Artemia* se ha realizado mediante dos tipos de ensayos diferentes para cada una. Mediante las dos técnicas empleadas en cada caso se obtuvieron los mismos resultados. La Act 211 mediante extensión del cebador y protección a Nucleasa S1 y las Act 302 y 403

mediante extensión del cebador y PCR anclado. El empleo del PCR anclado ya había sido descrito anteriormente con esta finalidad (Hirzmann et al., 1993). No fue posible obtener fragmentos protegidos de la digestión por la Nucleasa S1 en el caso de las isoformas Act 302 y Act 403. El pequeño tamaño del primer exón no codificante en ambos casos (35 pb en la Act 302 y 31 pb en la Act 403), unido al alto contenido en A y T que presentaban complicaba la hibridación con los mRNAs. Estos pudieron ser tal vez los problemas que impidieron obtener resultados positivos. El problema podría abordarse diseñando como sondas oligonucleótidos que cubran una secuencia mayor que el tamaño de dichos exones, donde la estabilidad pueda verse incrementada (oligonucleótidos de entre 40 y 80 nucleótidos). Parece fundamental que los oligonucleótidos empleados como sondas presenten un tamaño mínimo de 40 nucleótidos, ya que este es el valor límite considerado para que hibriden un DNA y un RNA. Por debajo de dicho tamaño, las fuerzas desestabilizadoras hacen peligrar la unión y favorecen la digestión total de la sonda (Sambrook et al., 1989). Otra posibilidad sería efectuar un ensayo de protección a ribonucleasa donde las uniones RNA:DNA sean más estables que las uniones híbridas DNA:DNA.

En los promotores eucariotas se ha descrito una secuencia consenso muy frecuente para el inicio de la transcripción (Bucher, 1990). Se trata del pentanucleótido TCAGT. En *Drosophila melanogaster* también ha sido descrita una posible secuencia consenso ATCAGTT (Hultmark et al., 1986). Sin embargo, los inicios de la transcripción en los genes de actinas son bastante heterogéneos y no parecen ajustarse a un único consenso, ni en Vertebrados ni en Invertebrados. Además, cuando aparece alguna secuencia consenso no suele coincidir exactamente con el sitio de inicio de la transcripción sino que está presente en su entorno. Así, por ejemplo, en la α -actina de músculo liso de humanos no se encuentra ninguna secuencia similar a la consenso (Reddy et al., 1990). En el caso de Invertebrados, la actina 5C citoplásmica de *Drosophila melanogaster* tiene tres posibles sitios de inicio de la transcripción, uno situado en el primer exón y dos en el segundo. En el sitio mayoritario de inicio de la transcripción, correspondiente al segundo exón, sí aparece una secuencia que se ajusta a la canónica (Bond y Davidson, 1986). El otro posible sitio de inicio de la transcripción del exón 2 presenta una secuencia con ligeros cambios (TCATT) (Vigoreaux y Tobin, 1987) y no aparece ninguna secuencia parecida en el comienzo del mRNA correspondiente al exón 1. Las actinas musculares de *Drosophila melanogaster* presentan secuencias próximas al consenso: TCGGT, la actina 87E (Manseau et al., 1988), TCACT la actina 79B (Sanchez et al., 1983) y TCATG la actina 88F (Sánchez et al., 1983). En dos de las isoformas de actina descritas en *Artemia*, la Act 211 y la Act 403 encontramos una secuencia muy parecida a la descrita en *Drosophila*. Ambas presentan un pentanucleótido TTAGT, donde 4 de los 5 nucleótidos son iguales a los que integran la secuencia consenso. En la actina 302, por el contrario, no aparece ninguna secuencia similar.

La heterogeneidad es la misma si consideramos el nucleótido puntual de inicio de la transcripción. El primer nucleótido puede ser cualquiera, ya que se han descrito inicios de la transcripción a partir de todas y cada una de las bases. El primer nucleótido del mRNA es una adenina en la isoforma Act 211 en los tres posibles inicios de la transcripción (-81) y (-76)- (-75). Esto mismo ocurre, por ejemplo, en la β -actina humana (Ng et al., 1985), la γ -actina de músculo liso humano (Miwa et al., 1991), el mRNA transcrito mediante la activación del promotor distal de la actina citoplásmica 5C de *Drosophila melanogaster* o las isoformas musculares 87E (Manseau et al., 1988) o 79B (Sánchez et al., 1983) también de *Drosophila*. En la isoforma Act 302 el primer nucleótido del mRNA correspondiente al único inicio de la transcripción detectado es una timidina igual que lo descrito en el promotor proximal de la actina 5C de *Drosophila melanogaster* (Chung y Keller, 1990) o en la isoforma muscular 88F, también de *Drosophila* (Sánchez et al., 1983). Finalmente, en la isoforma Act 403 tres de los posibles inicios de la transcripción situados en posiciones (-65), (-64) y (-60) comienzan por el nucleótido guanina, como ocurre también en la α -actina de músculo liso vascular (Reddy et al., 1990), la γ -actina citoplásmica (Erba et al., 1988) o uno de los transcritos de la actina muscular 79B de *Drosophila melanogaster* (Sánchez et al., 1983).

La secuenciación y el análisis posterior de las regiones 5' ha permitido descubrir posibles secuencias reguladoras, algunas de carácter general o constitutivo y otras de carácter específico. Este estudio comparativo debe confirmarse posteriormente, llevando a cabo diferentes estudios funcionales *in vitro* e *in vivo*. Estos estudios funcionales deben incluir no sólo las regiones que preceden al primer exón sino también regiones situadas en intrones, en las que se han descrito zonas reguladoras como en la α -actina de músculo liso vascular en humanos (Nakano et al., 1991) o en la β -actina de carpa (Liu et al., 1991). Incluso se han descrito regiones reguladoras en las zonas 3' de algunos genes como el de la cadena ligera de la miosina (Donoghue et al., 1988). El análisis de la secuencia de nucleótidos de las posibles regiones promotoras de las tres isoformas de actina de *Artemia* (Figuras 23, 24 y 25 de Resultados) muestra la existencia de hipotéticos motivos reguladores. Entre los motivos de carácter constitutivo podríamos considerar la caja TATA. La isoforma Act 211 presenta una secuencia TTAAATTTTA en la posición funcional de las cajas canónicas (20-30 nucleótidos 5' respecto al sitio de inicio de la transcripción). No es una caja TATA canónica, pero quizás pudiera ser un sustituto funcional de la misma. Otros genes de actina con estas características son la γ -actina citoplásmica humana (Erba et al., 1988) y la isoforma de actina 79B (Sánchez et al., 1983) de *Drosophila melanogaster*. La isoforma Act 302 presenta una caja TATA canónica (TATAA) en su posición funcional y la isoforma Act 403 carece de caja TATA. En general, la ausencia de caja TATA ha sido relacionada con la existencia de más de un inicio de la transcripción. Este dato estaría de acuerdo con los resultados obtenidos para las isoformas de *Artemia*. Las actinas 211 y 403 carecen de caja TATA y presentan varios posibles inicios de la transcripción, mientras que la Act 302 con un único sitio de inicio presenta una caja TATA

canónica. También se ha descrito que los promotores de muchos genes constitutivos celulares carecen de caja TATA (LaThangue y Rigby, 1988). Este sería también el caso de las actinas 211 y 403, caracterizadas como citoplásmicas en los estudios de hibridación *in toto*. Otras secuencias de carácter general que aparecen en los promotores son CCAAT, AP-2 y Actin 5C-US para la Act 211; AP-1, CCAAT, Actin 5C-US y AP-3 para la Act 302 y AP-2, AP-1, SP-1 y Actin 5C-US para la Act 403. Además de estas secuencias generales la Act 302 tiene dos dominios MEF-2 y cuatro bHLH siendo ambos sitios de unión de factores de transcripción específicos de músculo, lo que estaría de acuerdo con la expresión muscular de esta isoforma observada en las hibridaciones *in toto*. La isoforma Act 403 tiene 5 cajas bHLH, una secuencia CARg y un dominio MEF-2. En este caso la expresión tisular observada (citoplásmica) no se corresponde con la aparición de secuencias de reconocimiento de factores musculares. Esto sugiere dos posibilidades: que estas cajas no sean funcionales o que esta isoforma se exprese en tejido muscular en un estadio de desarrollo más avanzado o incluso en el adulto, ya que los ensayos *in toto* se realizaron en nauplias (65 horas). La existencia de sitios de unión para factores miogénicos tales como los encontrados en las posibles regiones promotoras de las Act 302 y 403 se han descrito en las isoformas musculares de otras especies, en las que se ha demostrado su relevancia funcional. Por ejemplo, Lee et al. (1991) han demostrado la importancia del dominio CARg en el promotor de la α -actina de pollo, Sartorelli et al. (1990) estudiaron la activación a través de las regiones CARg y el sitio de unión de MyoD (proteína de la familia bHLH) en el promotor de la α -actina humana y Navankasattusas et al. (1992) la función del factor MEF-2 en músculo cardíaco.

El clonaje y la caracterización de las regiones promotoras de los tres genes de actina de *Artemia* abre la puerta a los estudios encaminados a conocer cómo se regula su transcripción durante la activación del quiste y su posterior desarrollo embrionario y larvario. Estos estudios podrían basarse en la comparación del quiste con estadios del desarrollo en que se ha demostrado la transcripción activa de estos genes. Sería interesante determinar, por ejemplo, los factores proteicos que se unen a estos promotores en ambos estadios. También es posible realizar ensayos de transfección en diversos sistemas celulares para determinar la funcionalidad de estos promotores y delimitar las regiones reguladoras. Desgraciadamente, la falta de tiempo ha impedido abordar estos estudios en la presente Tesis Doctoral.

3. RELACIONES EVOLUTIVAS.

Los datos obtenidos en esta Tesis han permitido hacer algunos estudios evolutivos de los genes de actina, cuyo interés radica en que son los primeros estudios realizados en actinas de Crustáceos. Estos estudios pueden hacerse a partir de la secuencia de los distintos genes, mediante la construcción de árboles filogenéticos. El conocimiento de la estructura de los

genes permite comparar también la posición de los intrones en los distintos genes. La existencia de intrones en la misma posición indicaría la proximidad filogenética de los mismos.

Parte de estos estudios evolutivos se habían realizado anteriormente para las actinas 211 y 403 (Macías y Sastre, 1990 y Hennessey et al., 1993). El haber completado la secuencia de la Act 302 ha permitido incluirla en este estudio. El árbol filogenético determinado para las actinas de *Artemia*, comparándolas con las de Insectos y Vertebrados ha mostrado que están muy próximas a las actinas de insectos (Figura 31). Comparten, por tanto, algunas de sus características, como es su mayor proximidad evolutiva a las actinas citoplásmicas de Vertebrados que a las musculares, como se expuso en la Introducción.

Uno de los aspectos más interesantes consistía en conocer la relación evolutiva entre las isoformas musculares de Crustáceos e Insectos. Mounier y Sparrow (1993) han encontrado que todas las actinas musculares que se han descrito en Insectos comparten algunos aminoácidos específicos y parecen provenir de una misma actina, formando una rama evolutiva común. Las actinas 205 y 211 de *Artemia* presentan una secuencia similar a las actinas musculares de Insectos y parecen tener el mismo origen evolutivo, por lo que estos autores sugerían que pudieran ser isoformas musculares. Los datos presentados en esta Tesis indican, por el contrario, que la Act 211 es una isoforma citoplásmica. Por otro lado, la Act 302, caracterizada como muscular, presenta mayor homología con las actinas citoplásmicas de Insectos y con la Act 403 de *Artemia*, también citoplásmica, que con las actinas musculares de insectos. Estos datos parecen indicar que la especialización de una de las isoformas de actina como específica de músculo puede haber sido un suceso relativamente tardío en los Artrópodos y habría ocurrido independientemente en Crustáceos e Insectos. Esta hipótesis explicaría porqué genes bastante homólogos, como el de la Act 211 de *Artemia* y los de las actinas 87E y 88F de *Drosophila melanogaster* presentan distinta especificidad de expresión tisular, siendo la primera citoplásmica y las otras dos musculares.

La comparación de la estructura de los genes es poco informativa para estudiar la evolución de los genes de actina de Artrópodos debido al escasísimo número de intrones que poseen las actinas de Insectos, como se indicó anteriormente. Estos datos indican sin embargo, que la escasez de intrones en los genes de actina no es una característica general de los Artrópodos sino, en todo caso, específica de los Insectos. La posición de los intrones en *Artemia* se asemeja más a la que presentan las isoformas humanas en cuanto a número y disposición en el gen. Los intrones pueden interrumpir la secuencia codificante en el primero, segundo o tercer nucleótido del triplete que codifica para un aminoácido. La mayor parte de los intrones interrumpen la secuencia codificante en fase 3, aunque pueden también aparecer en el primer nucleótido del triplete. Sin embargo, los que la interrumpen en fase 2 son menos frecuentes (sólo existen 5 casos distintos descritos entre las 40 posiciones estudiadas) (Weber

y Kabsch, 1994). Los intrones de las isoformas de actina de *Artemia* se han encontrado en cinco diferentes posiciones, tres interrumpen la secuencia codificante en fase 3 (las posiciones 41, 121 y 246) y dos en fase 1 (las posiciones 168 y 301). Este patrón es idéntico en los intrones comunes entre las isoformas de actina de *Artemia* y respecto a las posiciones de los intrones comunes con actinas de otros organismos.

La posición de los intrones si que puede ser, en cambio, informativa respecto a la evolución relativa de los propios genes de actina de *Artemia*. Los genes Act 211 y Act 302 comparten dos intrones, los situados en la región 5' no traducida y entre los codones 41 y 42. Los genes Act 211 y Act 403 comparten tres intrones, localizados en la región 5' no traducida y en los codones 41-42 y 168. Por su parte, las actinas 302 y 403 comparten cinco intrones, situados en la región 5' no traducida y en los codones 41-42, 121-122, 246-247 y 301. Es posible elaborar diferentes modelos que intenten explicar su evolución. Uno de ellos podría ser el siguiente: como hipótesis inicial, podría establecerse la existencia de un gen que contara con intrones en las posiciones 5' no traducidas, 41-42 y 168. Este gen se correspondería con la isoforma Act 211 (citoplásmica). Tras una duplicación de dicho gen, seguida de la inserción de tres nuevos intrones en las posiciones 121-122, 246-247 y 301 en una de las copias, daría lugar a la isoforma Act 403 también de carácter citoplásmico. Una nueva duplicación de este gen, seguida de la delección del intrón en posición 168 en una de las copias, originaría la isoforma Act 302, específica de tejido muscular. Este modelo es totalmente compatible con el árbol filogenético que se ha propuesto y explicaría la proximidad evolutiva entre las isoformas Act 302 y Act 403, al mismo tiempo que su relativa lejanía con la isoforma Act 211.

La comparación de la estructura de los genes de actina de *Artemia* con la de otras especies aporta algunos datos acerca del origen evolutivo de los intrones. Como se deduce de la Figura 28, la posición de algunos intrones se conserva mucho a lo largo de la evolución, la posición de otros se conserva sólo en varios grupos y la de otros es muy variable, habiéndose descrito en un único organismo. Como se señaló en la Introducción, existen dos hipótesis acerca del origen de los intrones: una postula que existen desde el origen de los genes y se van perdiendo durante su evolución, mientras que la otra postula que se van insertando progresivamente en los genes. Algunos datos del estudio comparativo de los genes de *Artemia* apoyarían el modelo de inserción de los intrones debido a la presencia en *Artemia* de dos intrones situados en los codones 168 y 246-247, que únicamente se han descrito en especies muy alejadas filogenéticamente de *Artemia*, un nemátodo (*Onchocerca volvulus*) y un alga verde (*Volvox carterii*). Pensamos que es mucho más probable que estos intrones se hayan introducido en los genes de *Artemia* y alguno de ellos también, por azar, en el mismo sitio de los nemátodos o algas verdes que no que se hayan perdido en el resto de las especies. Existe además otro intrón, situado en el codon 301, presente en los genes Act 302 y Act 403 que no se había encontrado en ningún otro gen de actina.

En todas las isoformas de actina descritas en *Artemia*, las secuencias originadas tras la eliminación de los intrones, denominadas sitios de procesamiento, se ajustan a la secuencia consenso C/AAG•A/G donde • es la posición donde se integra el intrón (Weber y Kabsch, 1994). Esta característica no aparece en otros genes descritos en *Artemia* (Escalante y Sastre, 1994) y parece ser una peculiaridad de los genes de actinas. De acuerdo con el modelo de la ganancia de intrones a lo largo de la evolución (Palmer y Logsdon, 1991) algunos autores consideran que esta secuencia es una de las muchas que aparecen a lo largo de la secuencia codificante de la proteína en la que hipotéticamente podría integrarse un intrón (Dibb y Newman, 1989 y Weber y Kabsch, 1994). Esta característica se repite en las tres isoformas de actina de *Artemia*. Unicamente existen dos excepciones en dos posiciones de inserción de un intrón. La primera se produce en el sitio de procesamiento del intrón 5' de la Act 302. En este caso la secuencia es TTG•G. La segunda excepción se produce en el sitio de procesamiento entre los exones 6 y 7 (aminoácido 301) de la Act 403 de *Artemia* donde la secuencia es CTG•G. Estas dos excepciones de la secuencia consenso ya estaban descritas, una en vertebrados y otra en invertebrados. La actina muscular 88F de *Drosophila melanogaster* presenta en el sitio de procesamiento correspondiente al aminoácido 307 una secuencia idéntica a la que aparece en la isoforma Act 403 de *Artemia* (Sánchez et al., 1983). La γ -actina de músculo liso tipo entérico presenta en el sitio de procesamiento correspondiente al aminoácido 267 una secuencia igual a la descrita para la Act 302 (Ng et al., 1985). Además de estas excepciones existen otras en las que varían uno o dos de los nucleótidos penúltimo y antepenúltimo del primer exón implicado en el procesamiento, pero nunca el último del primer exón, ni el primero del segundo. Así, por ejemplo, en la actina 87E muscular de *Drosophila melanogaster* la secuencia de procesamiento es ACG•G (Manseau et al., 1988) en el intrón 5'; en la γ -actina citoplásmica de humano (Erba et al., 1988) es TGG•G en la posición 267 de la proteína; en la β -actina humana (Ng et al., 1985) es CTG•G también en el aminoácido 267 y en la γ -actina de músculo liso de tipo entérico de humano la secuencia es TCG•G (Miwa et al., 1991) en la secuencia de procesamiento del intrón situado en posición 5'. Todos estos datos sugieren, por lo tanto, que de la secuencia establecida como consenso C/AAG•A/G, existen 2 posiciones fundamentales para la inserción de un intrón y 2 que pueden ser variables. Es fundamental que el último nucleótido del primer exón implicado en el procesamiento sea una guanina y que el primer nucleótido del segundo exón sea una purina (adenina o guanina). Las otras dos bases de la secuencia establecida como consenso pueden sufrir pequeños cambios. Estos mismos resultados se obtienen tras los estudios con los genes de tubulinas (Dibb y Newman, 1989). Esto quiere decir que si los intrones se han ido ganando en los llamados sitios de procesamiento a lo largo de la evolución en estas dos familias de genes, los intrones nos son tan antiguos como las secuencias codificantes que los limitan. Por lo tanto, estos intrones no han podido estar envueltos en la evolución inicial de ambos genes.

La comparación de las estructuras de los genes de actina de *Artemia* con las de Insectos sugiere, por otra parte, que puede haber existido una pérdida de intrones en los genes de los Insectos. Los casos más indicativos pueden ser los de los intrones situados en los codones 41-42 ó 121-122, que existen en gran número de genes de actina citoplásmicos y musculares de Vertebrados y se conservan en los genes de *Artemia*. El árbol filogenético elaborado con estas secuencias nos indicaría que todos estos genes de actina tienen un origen común y que los genes de Insectos y de *Artemia* divergieron recientemente. Pensamos que el modelo más probable acerca de la evolución de estos genes, sería que los genes ancestrales de actinas poseían estos intrones, que se han conservado en Vertebrados y Crustáceos y, en cambio, se habrían perdido en Insectos.

En resumen, pensamos que el análisis comparativo de la estructura de los genes de actina de *Artemia* con otros organismos apoya, en general, la hipótesis de que los intrones se han ido insertando en los genes a lo largo de la evolución. También sugieren que este proceso es reversible y que algunos intrones pueden haberse vuelto a perder. En particular, parece haber existido algún tipo de presión evolutiva que ha motivado la pérdida de gran parte de los intrones en los genes de actinas de los Insectos, que no se observa en los genes de Crustáceos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1. Se han analizado los niveles de expresión de los mRNAs de tres isoformas de actina durante el desarrollo del quiste de *Artemia*. Las isoformas Act 211 y Act 403 se expresan en el quiste, se inducen ligeramente en los primeros estadios y sufren un fuerte incremento entre las 6 y las 16 horas del desarrollo. La isoforma Act 302 no se expresa en el quiste, induciéndose su expresión a partir de las 10 horas del desarrollo post-gastrular.
2. Se ha determinado la expresión espacial de estas isoformas de actina en nauplias de *Artemia*. Las actinas 211 y 403 se expresan de forma generalizada y pueden considerarse citoplásmicas, mientras que la actina 302 se expresa específicamente en las fibras musculares de antenas y mandíbulas.
3. Se han aislado y caracterizado clones genómicos que contienen los genes completos de las tres isoformas de actina. El gen de la Act 211 abarca 14.7 kb y está dividido en cuatro exones, el de la Act 302 tiene una longitud de 10.5 kb, presentando seis exones mientras que el gen de la Act 403, con un tamaño de 13.1 kb, posee siete exones.
4. Los intrones de estos genes se localizan en cinco posiciones diferentes a lo largo de la secuencia codificante. Una de ellas es común para las tres isoformas, la situada entre los aminoácidos 41 y 42. Las otras cuatro son comunes en dos de ellas. La existencia de intrones en las posiciones 41-42 y 121-122 se ha descrito también en los genes de actina de Vertebrados. El intrón en la posición 168 únicamente ha sido descrito en *Artemia* y el nemátodo *Onchocerca volvulus*. El intrón en la posición 246-247 se ha encontrado sólo en *Artemia* y el alga verde *Volvox carterii*. El intrón en la posición 301 no se había descrito hasta ahora en ningún otro organismo. Las tres isoformas presentan además un intrón en la región 5' no codificante.
5. Se han identificado los sitios de inicio de la transcripción de estos genes. Se han detectado tres posibles sitios de inicio en la actina 211, cuatro en la 403 y uno en la 302. El análisis de la región de DNA que precede al origen de transcripción ha permitido localizar posibles zonas de unión de factores generales de la transcripción en los genes de las tres isoformas, así como de factores miogénicos en los genes de las isoformas Act 302 y Act 403.
6. La comparación de las secuencias de aminoácidos de las actinas de *Artemia* con las de otros organismos ha mostrado su proximidad filogenética con las actinas de Insectos. Sin embargo, la isoforma muscular de *Artemia* (Act 302) está más próxima a las actinas citoplásmicas de Insectos que a las musculares. Por el contrario, una de las actinas citoplásmicas de *Artemia* (Act 211) está más próxima a las isoformas musculares de Insectos. Estos datos sugieren que la especialización de isoformas musculares ha sido un evento independiente en Crustáceos e Insectos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.

- Adam, L., Laroche, A., Barden, A., Lemieux, G., and Pallotta, D. (1991).** An unusual actin-encoding gene in *Physarum polycephalum*. *Gene* 106, 79-86.
- Akhurst, R.J., Calzone, F.J., Lee, J.J., Britten, R.J., and Davidson, E.H. (1987).** Structure and organization of the CyIII actin gene subfamily of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Mol. Biol.* 194, 193-203.
- Alonso, S., Garner, I., Vandekerckhove, J., and Buckingham, M. (1990).** Genetic Analysis of the Interaction Between Cardiac and Skeletal Actin Gene Expression in Striated Muscle of the Mouse. *J. Mol. Biol.* 211, 727-738.
- Amaldi, P.P., Felicetti, L., and Campioni, N. (1977).** Flow of informational RNA from cytoplasmic poly(A)-containing particles to polyribosomes in *Artemia salina* cysts at early stages of development. *Dev. Biol.* 59, 49-61.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1994).** Current protocols in Molecular Biology (New York: John Wiley and Sons, Inc.,).
- Batuecas, B., Garesse, R., Calleja, M., Valverde, J.R., and Marco, R. (1988).** Genome organization of *Artemia* mitochondrial DNA. *Nucl. Acid. Res.* 16, 6515-6529.
- Bhattacharyya, K.K., Bergstrom, E.E., and Hokin, L.E. (1990).** Molecular cloning of the β -subunit of the Na, K-ATPase in the brine shrimp *Artemia*. The cDNA-derived amino acid sequence shows low homology with the β -subunit of vertebrates, except in the single transmembrane and the carboxy-terminal domains. *FEBS Let.* 269, 233-238.
- Biggin, M.D., Gibson, T.J., and Hong, G.F. (1983).** Buffer gradient gels and ^{35}S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 3963-3965.
- Boardman, M., Cross, G.S., Jones, E.A., and Woodland, H.R. (1992).** Regulation of expression of a *Xenopus borealis* embryonic/larval $\alpha 3$ skeletal-actin gene. *Eur. J. Biochem.* 208, 241-249.
- Bond, B.J. and Davidson, N. (1986).** The *Drosophila melanogaster* Actin 5C gene uses two transcription initiation sites and three polyadenylation sites to express multiple mRNA species. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2080-2088.
- Bork, P., Sander, C., and Valencia, A. (1992).** An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp 70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 7290-7294.
- Braun, T., Bober, E., Winter, B., Rosenthal, N., and Arnold, H.H. (1989).** Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J.* 9, 821-831.
- Browne, R.A., Sorgeloos, P., and Trotman, C.N.A. (1991).** *Artemia* Biology (Boston: CRC Press).
- Bucher, P. (1990).** Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* 212, 563-578.
- Cavalier-Smith, T. (1985).** Selfish DNA and the origin of introns. *Nature* 315, 283-284.

- Cavalier-Smith, T.** (1991). Intron phylogeny: a new hypothesis. *TIG* 7, 145-148.
- Chen, E.J. and Seeburg, P.H.** (1985). Supercoil sequencing: a fast simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4, 165-170.
- Chung, Y-T. and Keller, E.B.** (1990). Regulatory elements mediating transcription from the *Drosophila melanogaster* Actin 5C proximal promoter. *Mol. Cell. Biol.* 10, 206-216.
- Church, G.M., Ephrussi, W., Gilbert, W., and Tonegawa, S.** (1985). Cell type specific contacts to immunoglobulin enhancers in nuclei. *Nature* 313, 798-801.
- Cleveland, D.W., Hughes, S.H., Stubblefield, E., Kirschner, M.W., and Varmus, H.E.** (1981). Multiple α and β tubulin genes represent unlinked and dispersed gene families. *J. Biol. Chem.* 256, 3130-3134.
- Cook, R.K., Sheff, D.R., and Rubenstein, P.A.** (1994). Unusual metabolism of yeast actin amino terminus. *J. Biol. Chem.* 266, 16825-16833.
- Courchesne-Smith, C.L. and Tobin, S.L.** (1989). Tissue-Specific Expression of the 79B Actin Gene during *Drosophila* Development. *Dev. Biol.* 133, 313-321.
- Cresnar, B., Mages, W., Muller, K., Salbaum, J.M., and Schmitt, R.** (1990). Structure and expression of a single actin gene in *Volvox carterii*. *Curr. Genet.* 18, 337-346.
- Cruces, J., Diaz-Guerra, M., Gil, I., and Renart, J.** (1989). The 5S rRNA-histone repeat in the crustacean *Artemia*: structure, polymorphism and variation of the 5S rRNA segment in different populations. *Nucl. Acid. Res.* 17, 6283-6297.
- Darnell, J.E. and Doolittle, W.F.** (1986). Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 1271-1275.
- de Chaffoy, D., De Maeyer-Criel, G., and Kondo, M.** (1978). On the permeability and formation of the embryonic cuticle during development "in vivo" and "in vitro" of *Artemia salina* embryos. *Differentiation* 12, 99-109.
- Decleir, W., Moens, I., Slegers, H., Sorgeloos, P., and Jaspers, E.** (1987). *Artemia*: Research and its applications (Wetteren, Belgium: Universa Press).
- Diaz-Guerra, M., Quintanilla, M., Palmero, I., Sastre, L., and Renart, J.** (1989). Differential expression of a gene highly homologous to c-ras during the development of the brine shrimp *Artemia*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 162, 802-808.
- Dibb, N.J. and Newman, A.J.** (1989). Evidence that introns arose at proto-splice sites. *EMBO J.* 8, 2015-2021.
- Donoghue, M., Ernst, H., Wentworth, B., Nadal-Ginard, B., and Rosenthal, N.** (1988). A muscle-specific enhancer is located at the 3' end of the myosin light-chain 1/3 gene locus. *Genes Dev.* 2, 1779-1790.
- Dorit Yale, R.L. and Ohara, O.** (1993). *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: John Wiley and sons, Inc.). pp 15.6.1- 15.6.10.
- Engel, J.N., Gunning, P.W., and Kedes, L.** (1981). Isolation and characterization of human actin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 4674-4678.

- Erba, H.P., Eddy, R., Shows, T., Kedes, L., and Gunning, P.** (1988). Structure, Chromosome Location, and Expression of the Human γ -actin gene: Differential evolution, location, and expression of the cytoskeletal β - and γ -actin genes. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1775-1789.
- Escalante, R. and Sastre, L.** (1993). Similar alternative splicing events generate two sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase isoforms in the Crustacean *Artemia franciscana* and in vertebrates. *J. Biol. Chem.* **268**, 14090-14095.
- Escalante, R. and Sastre, L.** (1994). Structure of *Artemia franciscana* Sarco/Endoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 13005-13012.
- Faisst, S. and Meyer, S.** (1992). Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucl. Acid. Res.* **20**, 3-26.
- Field, K.G., Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Ghiselin, M.T., Raff, E.C., Pace, N.R., and Raff, R.A.** (1988). Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* **239**, 748-753.
- Files, J.G., Carr, S., and Hirsh, D.** (1983). Actin gene family in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **164**, 355-375.
- Franco, E., Behrens, M.M., Díaz-Guerra, M., and Renart, J.** (1994). Structure and expression of a polyubiquitin gene from the crustacean *Artemia*. *Gene expression* (in press)
- French, B.A., Chow, K., Olson, E.N., and Schwartz, R.J.** (1991). Heterodimers of myogenic helix-loop-helix regulatory factors and E12 bind a complex element governing myogenic induction of the avian cardiac α -actin promoter. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2439-2450.
- Frischauf, A., Lehrach, H., Poustka, A., and Murray, N.** (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**, 827-842.
- Fuchs, R.** (1991). MacPattern: Protein pattern searching on the Apple Macintosh. *Comput. Applic. Biosci.* **7**, 105-106.
- Fyrberg, E.A., Bond, B.J., Hershey, N.D., Mixter, K.S., and Davidson, N.** (1981). The Actin Genes of *Drosophila*: Protein Coding Regions Are Highly Conserved but Intron Positions Are Not. *Cell* **24**, 107-116.
- Fyrberg, E.A., Kindle, K.L., and Davidson, N.** (1980). The Actin genes of *Drosophila* : a dispersed multigenes family. *Cell* **19**, 365-378.
- Fyrberg, E.A., Mahaffey, J.W., Bond, B.J., and Davidson, N.** (1983). Transcripts of the six *Drosophila* Actin genes accumulate in a stage-and tissue-specific manner. *Cell* **33**, 115-123.
- Gallego, M. E., Díaz-Guerra, M., Cruces, J., Sebastián, J., and Renart, J.** (1986). Characterization of two types of rRNA gene repeat units from the crustacean *Artemia* . *Gene* **48**, 175-182.
- Ghosh, D.** (1990). A relational data base of transcriptional factors. *Nucl. Acid. Res.* **18**, 1749-1756.
- Gil, I., Gallego, M.E., Renart, J., and Cruces, J.** (1987). Identification of the transcriptional initiation of ribosomal RNA genes in the crustacean *Artemia*. *Nucl. Acid. Res.* **15**, 6007-6016.
- Gilbert, W., Marchionni, M., and McKnight, G.** (1986). On the antiquity of introns. *Cell* **46**, 151-154.

- Gossett, L.A., Kelvin, D.J., Sternberg, E.A., and Olson, E.N.** (1989). A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5022-5033.
- Gough, J. and Murray, N.** (1983). Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **166**, 1-19.
- Grossberger, D.** (1987). Minipreps of DNA from bacteriophage lambda. *Nucl. Acid. Res.* **15**, 6737.
- Hawkins, J.D.** (1988). A survey on intron and exon lengths. *Nucl. Acid. Res.* **16**, 9893-9908.
- Hemmati-Brivanlou, A., Frank, D., Bolce, M.E., Brown, M.D., Sive, H.L., and Harland, R.M.** (1990). Localization of specific mRNAs in *Xenopus* embryos by whole-mount *in situ* hybridization. *Development* **110**, 325-330.
- Hennessey, E.S., Drummond, D.R., and Sparrow, J.C.** (1991). Post-translational processing of the amino terminus affects actin function. *Eur. J. Biochem.* **197**, 345-352.
- Hennessey, E.S., Drummond, D.R., and Sparrow, J.C.** (1993). Molecular genetics of actin function. *Biochem. J.* **282**, 657-671.
- Herman, I.M.** (1993). Actin isoforms. *Current Opinion in Cell Biology* **5**, 48-55.
- Higgins, D.G. and Sharp, P.M.** (1989). *Comput. Applic. Biosci.* **5**, 151-153.
- Hightower, R.C. and Meagher, R.B.** (1986). The molecular evolution of actin. *Genetics* **114**, 315-332.
- Hiromi, Y. and Hotta, Y.** (1985). Actin gene mutations in *Drosophila* ; heat shock activation in the indirect flight muscles. *EMBO J.* **4**, 1681-1687.
- Hirono, M., Endoh, H., Okada, N., Numata, O., and Watanabe, Y.** (1987). Cloning and sequencing of the *Tetrahymena* actin gene and identification of its gene product. *J. Mol. Biol.* **194**, 181-192.
- Hirzmann, J., Luo, D., Hahnen, J., and Hobom, G.** (1993). Determination of messenger RNA 5'-ends by reverse transcription of the cap structure. *Nucl. Acid. Res.* **21**, 3597-3598.
- Holmes, D.S. and Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- Hsu, Chin-Yi.J. and Frankel, F.R.** (1987). Effect of Estrogen on the Expression of mRNAs of Different Actin Isoforms in Immature Rat Uterus. *J. Biol. Chem.* **262**, 9594-9600.
- Hultmark, D., Klemenz, R., and Gehring, W.J.** (1986). Translational and transcriptional control elements in the untranslated leader of the heat-shock gene *hsp22*. *Cell* **44**, 429-438.
- Jones, N.** (1994). Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell* **61**, 9-11.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., and Holmes, K.C.** (1990). Atomic Structure of the actin: DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44.

- Kasturi, K.N. and Bona, C.A.** (1994). Analysis of the expression immunoglobulin gene repertoire by screening libraries derived from PCR-amplified cDNA. *Nucl. Acid. Res.* **19**, 6339-6340.
- Kleinsmith, L.J., Peters, N.K., and Zeigler, M.E.** (1984). Regulation of nonmuscle actin gene expression during early development. In *Recombinant DNA and cell proliferation*. G.S. Stein and J.L. Stein, eds. (Londres: Academic Press, Inc.), pp. 273-301.
- Koller, H.T., Frondorf, K.A., Maschner, P.D., and Vaughn, J.C.** (1987). *In vitro* transcription from multiple spacer rRNA gene promoters during early development and evolution of the intergenic spacer in the brine shrimp *Artemia*. *Nucl. Acid. Res.* **15**, 5391-5411.
- Krause, M., Wild, M., Rosenzweig, B., and Hirsh, D.** (1989). Wild-type and mutant actin genes in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **208**, 381-392.
- Kusakabe, T., Makabe, K.W., and Satoh, N.** (1992). Tunicate muscle actin genes. Structure and organization as a gene cluster. *J. Mol. Biol.* **227**, 955-960.
- La Thangue, N.B. and Rigby, P.W.H.J.** (1990). Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription. In *Transcription and splicing*. B.D. Hames and D.M. Glover, eds. (Oxford, Washington DC: IRL Press), pp. 1-42.
- Lee, T., Chow, K., Fang, P., and Schwartz, R.J.** (1991). Activation of skeletal α -actin gene transcription: the cooperative formation of serum response factor-binding complexes over positive *cis*-acting promoter serum response elements displaces a negative-acting nuclear factor enriched in replicating myoblasts and nonmyogenic cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5090-5100.
- Lees-Miller, J.P., Henry, G., and Helfman, D.M.** (1992). Identification of *act2*, an essential gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* that encodes a protein related to actin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 80-83.
- Li, W. and Graur, D.** (1991). Gene structure and mutation. In *Fundamentals of Molecular Evolution*. W. Li and D. Graur, eds. (Sunderland, USA: Sinauer Associates), pp. 3-19.
- Liu, Z., Moav, B., Faras, A.J., Guise, K.S., Kapuscinski, A.R., and Hackett, P.** (1991). Importance of the CArG box in regulation of β -actin encoding genes. *Gene* **108**, 211-217.
- MacKeown, M., Taylor, W.C., Kindle, K.L., Firtel, R.A., Bender, W., and Davidson, N.** (1978). Multiple heterogeneous actin genes in *Dyctiostelium*. *Cell* **15**, 789-800.
- Macias, M-T., Palmero, I., and Sastre, L.** (1991). Cloning of a cDNA encoding an *Artemia franciscana* Na/K ATPase α -subunit. *Gene* **105**, 197-204.
- Macias, M.T. and Sastre, L.** (1990). Molecular cloning and expression of four actin isoforms during *Artemia* development. *Nucl. Acid. Res.* **18**, 5219-5225.
- Manning, A.M., Powell, R.J., Trotman, C.N.A., and Tate, W.P.** (1990). Developmental expression and cDNA cloning of globin genes from the brine shrimp *Artemia*. *The New Biologist* **2**, 77-83.
- Manseau, L.J., Ganetzky, B., and Craig, E.A.** (1988). Molecular and genetic characterization of the *Drosophila melanogaster* 87E actin gene region. *Genetics* **119**, 407-420.
- Marco, R., Garesse, R., Cruces, J., and Renart, J.** (1991). *Artemia* molecular genetics. In *Artemia* biology. R.A. Browne, P. Sorgeloos, and C.N.A. Trotman, eds. (Boca Raton, Florida: CRC Press), pp. 1-19.

- Maxam, A.M. and Gilbert, W.** (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzimology* **65**, 499-559.
- McHugh, K.M. and Lessard, J.L.** (1988). The Development Expression of the Rat α -vascular and γ -Enteric Smooth Muscle Isoactins: Isolation and Characterization of a Rat γ -Enteric Actin cDNA. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5224-5231.
- McLaughlin, P.J., Gooch, J.T., Mannherz, H.G., and Weeds, A.G.** (1993). Structure of gelsolin segment 1- actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* **364**, 685-692.
- Michelson, A.M., Abmayr, S.M., Bate, M., Martinez Arias, A., and Maniatis, T.** (1990). Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* **4**, 2086-2097.
- Minor, J.E., Lee, J.J., Akhurst, R.J., Leahy, P.S., Britten, R.J., and Davidson, E.H.** (1987). Sea Urchin actin gene linkages determined by genetic segregation. *Dev. Biol.* **122**, 291-295.
- Minty, A. and Kedes, L.** (1986). Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2125-2136.
- Minty, A.J., Alonso, S., Guenet, J-L., and Buckingham, M.E.** (1983). Number and organization of actin related sequences in the mouse genome. *J. Mol. Biol.* **167**, 77-101.
- Miwa, T., Boxer, L.M., and Kedes, L.** (1987). CARG boxes in the human cardiac α -actin gene are core binding sites for positive trans-acting regulatory factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 6702-6706.
- Miwa, T., Manabe, Y., Kurokawa, K., Kamada, S., Kanda, N., Bruns, G., Ueyama, H., and Kakunaga, T.** (1991). Structure, chromosome location, and expression of the human smooth muscle (enteric type) γ -actin gene: evolution of six human actin genes. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3296-3306.
- Mohun, T.J., Brennan, S., Dathan, N., Fairman, S., and Gurdon, J.B.** (1984). Cell type-specific activation of actin genes in the early amphibian embryo. *Nature* **311**, 716-721.
- Moreno, A., Mendez, R., and de Haro, Cesar.** (1991). Characterization of cell-free protein-synthesis systems from undeveloped and developing *Artemia* embryos. *Biochem. J.* **276**, 809-816.
- Morris, J.E.** (1971). Hydration, its reversibility, and the beginning development in the brine shrimp *Artemia salina*. *Comp. Biochem. Physiol.* **39(A)**, 843-840.
- Mounier, N., Gouy, M., Mouchiroud, D., and Prudhomme, J.C.** (1992). Insect muscle actins differ distinctly from invertebrate and vertebrate cytoplasmic actins. *J. Mol. Evol.* **34**, 406-415.
- Mounier, N. and Prudhomme, J.C.** (1991). Differential expression of muscle and cytoplasmic actin genes during development of *Bombyx mori*. *Insect. Biochem.* **21**, 523-533.
- Mounier, N. and Sparrow, J.C.** (1993). Muscle actin genes in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* **105**, 231-238.
- Muller, M.M., Gerster, T., and Schaffner, W.** (1988). Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. *Eur. J. Biochem.* **176**, 485-495.

- Muscat, G.E.O., Gustafson, T.A., and Kedes, L.** (1988). A Common Factor Regulates Skeletal and Cardiac α -Actin Gene Transcription in Muscle. *Mol. Cell. Biol.* 8, 4120-4133.
- Nakano, Y., Nishihara, T., Sasayama, S., Miwa, T., Kamada, S., and Kakunaga, T.** (1991). Transcriptional regulatory elements in the 5' upstream and first intron regions of the human smooth muscle (aortic type) α -actin encoding gene. *Gene* 99, 285-289.
- Nakayasu, H. and Ueda, K.** (1983). Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 143, 55-62.
- Navankasattusas, S., Zhu, H., Garcia, A.V., Evans, S.M., and Chien, K.R.** (1992). A Ubiquitous Factor (HF-1a) and a Distinct Muscle Factor (HF-1b/MEF-2) Form an E-Box-Independent Pathway for Cardiac Muscle Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* 12, 1469-1479.
- Ng, S., Gunning, P., Eddy, R., Ponte, P., Leavitt, J., Shows, T., and Kedes, L.** (1985). Evolution of the functional human β -actin gene and its multi pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2720-2732.
- Olson, E.** (1990). MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev.* 4, 1454-1461.
- Ordahl, C.P.** (1986). The skeletal and cardiac α -actin genes are coexpressed in early embryonic striated muscle. *Dev. Biol.* 117, 488-492.
- Osuna, C. and Sebastián, J.** (1980). Levels of the RNA polymerase during early larval development of *Artemia*. *Eur. J. Biochem.* 109, 383-389.
- Palmer, J.D. and Logsdon, Jr.J.M.** (1991). The recent origins of introns. *Current Opinion in Genetics and Development* 1, 470-477.
- Palmero, I. and Sastre, L.** (1989). Complementary DNA cloning of a protein highly homologous to mammalian sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase from the crustacean *Artemia*. *J. Mol. Biol.* 210, 737-748.
- Pérez, M.L., Valverde, J.R., Batuecas, B., Amat, F., Marco, R., and Garesse, R.** (1994). Speciation in the *Artemia* Genus: mitochondrial DNA analysis of bisexual and parthenogenetic brine shrimps. *J. Mol. Evol.* 38, 156-168.
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A.** (1986). Actin and acting-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 987-1035.
- Rackwitz, H.R., Zehetner, G., Frischasuf, A-M., and Lehrach, H.** (1984). Rapid restriction mapping of DNA cloned in lambda phage vectors. *Gene* 30, 195-200.
- Raineri, M.** (1989). Enzyme markers in development: cholinesterase (ChE), acid hydrolases, alkaline phosphatase (ALP) and aminopeptidase (AP) in embryos and larvae of *Artemia*. In *Cell and Molecular Biology of Artemia development*. A.H. Warner, T.H. MacRae, and J.C. Bagshaw, eds. (New York: Plenum Press), pp. 131-156.
- Rayment, I., Holden, H.M., Whittaker, M., Yohn, C.B., Lorenz, M., Holmes, K.C., and Milligan, R.A.** (1993). Structure of the Actin-Myosin Complex and Its Implications for Muscle Contraction. *Science* 261, 58-65.
- Reddy, S., Ozgur, K., Lu, M., Chang, W., Mohan, S.R., Kumar, C.C., and Ruley, H.E.** (1990). Structure of the Human Smooth Muscle α -Actin Gene. *J. Biol. Chem.* 265, 1683-1687.

- Rubenstein, P.A. and Martin, D.** (1983a). NH₂-terminal processing of actin in mouse L- cells *in vivo*. J. Biol. Chem. 258, 3961-3966.
- Rubenstein, P.A. and Martin, D.J.** (1983b). NH₂-terminal processing of *Drosophila melanogaster* actin. Secuential removal of two amino acids. J. Biol. Chem. 258, 11354-11360.
- Saitou, N. and Nei, M.** (1987). Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (New York, USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Sánchez, F., Tobin, S.L., Rdest, U., Zulauf, E., and McCarthy, B.J.** (1983). Two *Drosophila* actin genes in detail. Gene structure, protein structure and transcription during development. J. Mol. Biol. 163, 533-551.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463-5467.
- Sartorelli, V., Webster, K., and Kedes, L.** (1990). Muscle specific expression of the cardiac α -actin gene requires MyoD, CArG-box binding factor, and Sp1. Genes Dev. 4, 1811-1822.
- Sastre, L., Palmero, I., Macias, M-T., Gil, I., Franco, E., Dominguez, E., Diaz-Guerra, M., Quintanilla, M., Cruces, J., and Renart, J.** (1989). cDNA cloning of developmentally regulated *Artemia* genes. In Cell and molecular biology of *Artemia* development. A.H. Warner, T.H. MacRae, and J.C. Bagshaw, eds. (Plenum Publishing Corporation), pp. 319-327.
- Sawadogo, M.** (1990). RNA Polymerase B (II) and general transcription factors. Annu. Rev. Biochem. 59, 711-754.
- Schedl, T. and Dove, W.F.** (1982). Mendelian analysis of the organization of actin sequences in *Physarum polycephalum*. J. Mol. Biol. 160, 41-57.
- Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C.W., and Lindberg, U.** (1993). The structure of the crystalline profilin: β -actin. Nature 365, 810-816.
- Schwob, E. and Martin, R.P.** (1992). New yeast actin-like gene required late in the cell cycle. Nature 355, 179-182.
- Scott Young III, W.** (1992). *In situ* hybridization with oligodeoxyribonucleotide probes. In "In situ" Hybridization: A Practical Approach. D.G. Wilkinson, ed. (Oxford: Oxford University Press), pp. 33-44.
- Senapathy, P., Shapiro, M.B., and Harris, N.L.** (1990). Splice Junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. Methods Enzimol. 183, 252-278.
- Shapiro, M.B. and Senapathy, P.** (1987). RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. Nucl. Acid. Res. 15, 7155-7174.
- Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks, J.B.** (1986). In Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbour, New York, USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press), pp. 143-144.
- Sheterline, P. and Sparrow, J.C.** (1994). Protein Profile: Actin (London: Academic Press. ISSN: 1070-3667).

- Singer, M. and Berg, P.** (1991). Genes and Genomes (Oxford: Blackwell Scientific Publications).
- Slegers, H.** (1991). Enzyme activities through development: a synthesis of the activity and control of the various enzymes as the embryo matures. In *Artemia* biology. R.A. Browne, P. Sorgeloos, and C.N.A. Trotman, eds. (Boca Raton, Florida: CRC Press), pp. 37-73.
- Solomon, L.R. and Rubenstein, P.A.** (1985). Correct amino-terminal processing of Cardiac Muscle α -Isoactin (Class II) in a Nonmuscle Mouse Cell. *J. Biol. Chem.* 260, 7659-7664.
- Sorgeloos, P.** (1980). Life story of the brine shrimp *Artemia*. In *The brine shrimp Artemia*. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, and E. Jaspers, eds. (Wetteren, Bélgica: Universa Press), pp. 19-23.
- Straub, F.B.** (1942). (Studies, University of Szeged).
- Stutz, F. and Spohr, G.** (1987). A processed gene coding for a sarcomeric actin in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *EMBO J.* 6, 1989-1995.
- Sun, D.Y., Guo, J.Z., Hartmann, H.A., Uno, H., and Hokin, L.E.** (1992). Differential expression of the α_2 and beta messenger RNAs of the Na/K-ATPase in developing brine shrimps as measured by " *in situ* " hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 555-562.
- Tate, W.P. and Marshall, C.J.** (1991). Post-dormancy transcription and translation in the brine shrimp. In *Artemia* biology. R.A. Browne, P. Sorgeloos, and C.N. A. Trotman, eds. (Boca Raton, Florida: CRC Press), pp. 21-36.
- Tautz, D. and Pfeifle, C.** (1989). A non radiactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals a translational control of the segmentation gene *hunchback* . *Chromosoma* 98, 81-85.
- Thomas, M. and Davis, R.W.** (1974). Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with *Eco* RI restriction endonuclease. *J. Mol. Biol.* 91, 315.
- Tobin, S.L., Zulauf, E., Sánchez, F., Craig, E.A., and McCarthy, B.J.** (1980). Multiple Actin-Related Sequences in the *Drosophila melanogaster* Genome. *Cell* 19, 121-131.
- Tokunaga, K., Takeda, K., Kamiyama, K., Kageyama, H., Takenaga, K., and Sakiyama, S.** (1988). Isolation of cDNA Clones for Mouse Cytoeskeletal γ -Actin and Differential Expression of Cytoeskeletal Actin mRNAs in Mouse Cells. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3929-3933.
- Triezenberg, S.J.** (1993). Current Protocols in Molecular Biology (New York: John Wiley and sons, Inc.). pp 4.8.1- 4.8.5.
- Vandeckerckhove, J. and Weber, K.** (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 126, 783-802.
- Vandeckerckhove, J. and Weber, K.** (1979). The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle: a protein-chemical analysis of muscle actin differentiation. *Differentiation* 14, 123-133.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K.** (1984). Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins. *J. Mol. Biol.* 179, 391-413.

- Vigoreaux, J.O. and Tobin, S.L.** (1987). Stage-specific selection of alternative transcriptional initiation sites from the 5C actin gene of *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **1**, 1161-1171.
- Vinson, V.K., Archer, S.J., Lattman, E.E., Pollard, T.D., and Torchia, D.A.** (1993). Three dimensional solution structure of Acanthamoeba profilin-I. *J. Cell. Biol.* **122**, 1277-1283.
- Wahba, A.J. and Woodley, C.L.** (1984). Molecular aspects of development in the brine shrimp *Artemia*. *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* **31**, 221-265.
- Warner, A.H., MacRae, T.H., and Bagshaw, J.C.** (1989). Cell and molecular biology of *Artemia* development (New York: Plenum Press).
- Weber, K. and Kabsch, W.** (1994). Intron positions in actin genes seem unrelated to the secondary structure of the protein. *EMBO J.* **13**, 1280-1286.
- Wilkinson, D.G.** (1992). Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos. In "In situ" hybridization: A practical approach. D.G. Wilkinson, ed. (Oxford: Oxford University Press), pp. 75-83.
- Winter, B., Braun, T., and Arnold, H.** (1992). Co-operativity of functional domains in the muscle-specific transcription factor Myf-5. *EMBO J.* **11**, 1843-1855.
- Wright, W.E., Sassoon, D.A., and Lin, V.K.** (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56**, 607-617.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Zechel, K. and Weber, K.** (1978). Actins from mammals, bird, fish and slime mold characterized by isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **89**, 105-112.
- Zeng, W. and Donelson, J.E.** (1992). The actin genes of *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **55**, 207-216.